



FACULTAD DE MEDICINA

**TRATAMIENTO COADYUVANTE MEDIANTE
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE
LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.**

TESIS DOCTORAL

LUIS RIERA DEL MORAL

Madrid, 2013.



FACULTAD DE MEDICINA

**TRATAMIENTO COADYUVANTE MEDIANTE
CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE
LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.**

TESIS DOCTORAL

LUIS RIERA DEL MORAL

Madrid, 2013.



FACULTAD DE MEDICINA

TRATAMIENTO COADYUVANTE MEDIANTE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

LUIS RIERA DEL MORAL

DIRIGIDA POR:

**D. MARIANO GARCÍA ARRANZ
D. DAMIÁN GARCÍA OLMO**

Don MARIANO GARCÍA ARRANZ, Profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid y Director Científico del Laboratorio de Terapia Celular de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario La Paz y Don Damián García Olmo, Catedrático de Cirugía del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN:

Que Don Luis Riera del Moral, Médico Adjunto del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario La Paz ha estado trabajando bajo su dirección en el proyecto titulado “Tratamiento coadyuvante mediante células troncales mesenquimales de los aneurismas de aorta abdominal”, que ha sido desarrollado en la Unidad de Investigación de la Fundación Biomédica del hospital universitario La Paz, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne a su juicio las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesario para que pueda ser sometido a su lectura y discusión ante el tribunal.

Madrid 7 de Diciembre de 2012.

Fdo. Dr. Prof. García Arranz
Director de Tesis

Fdo. Dr. Prof. García Olmo
Tutor de Tesis

A Isabel, mi todo.

AGRADECIMENTOS.

Pienso que para un médico nunca acaba su periodo de formación, pero también creo que el doctorado es un momento importante en el camino que recorre un galeno. Y cuando miro hacia atrás en este momento no veo sino infinidad de personas muy queridas a las que agradecer su apoyo y ayuda en estos años de formación.

En primer lugar quiero agradecer muy especialmente por este *nuestro* trabajo a mi Director de Tesis, D. Mariano García Arranz. Me has enseñado que la perseverancia y el trabajo tienen siempre sus frutos y que éstos deben valorarse de un modo siempre optimista, como lo eres tú.

También quiero agradecer a D. Damián García Olmo su ayuda e inestimable apoyo en la construcción de esta tesis. Sin tu ilusión, tu visión y tu pasión en el campo de las células madre, nada de lo que hoy sucede en el Laboratorio de Terapia Celular del Hospital La Paz habría sido posible.

Gracias a todo el personal del Laboratorio de Terapia Celular, a David Alonso, Rocío Cano, Luz Vega y Susana Olmedillas por vuestra dedicación e inestimable ayuda con los cultivos y preparaciones.

Gracias al Dr. José Ramón Ramírez García, estupendo patólogo, por su colaboración en la valoración histológica de las muestras.

También debo agradecer la colaboración inestimable de D^a Carlota Largo Aramburu y a todo el personal del Servicio de Cirugía Experimental, Isabel, Toñi y Pablo. Es un placer trabajar con gente como vosotros, muchas gracias.

Si echo la vista atrás, aunque tampoco demasiado, debo agradecer también a mis compañeros del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario La Paz y especialmente a mis residentes, su vocación. Sois un verdadero estímulo para mí. Gracias.

No sería justo olvidarme de las personas más importantes en la formación de un médico. Sus maestros. Los doctores Álamo, Hernández, Minguela, Sáez, Fernández Heredero, Mendieta, Gutiérrez Nistal y Leblic me han enseñado todo lo que sé de la Cirugía Vascular y les estaré eternamente agradecido. También he tenido la suerte de aprender de los maestros de la Cirugía como el Prof. García Sancho y el Prof. Rodríguez Montes y de todo el Servicio de Cirugía General “C”, de quienes guardo un excelente recuerdo de los años de Residencia. Al Dr. Sánchez González, por enseñarme a fijarme en “las cosas verdaderamente importantes de la vida” durante la carrera de Medicina.

No me quiero olvidar de D. Martin Viera y de D^a María del Mar Murillo, dos de los muchos fantásticos profesores del Colegio Nuestra Señora del Recuerdo, que despertaron en mí el interés por la ciencia, la medicina y el amor al trabajo y me moldearon como persona.

De mis años de colegio he salvado uno de los tesoros más preciados de mi vida. Mis amigos. A ellos les agradezco profundamente su apoyo y su cariño todos estos años.

Y al comienzo del camino y siempre conmigo, quiero agradecer a mis padres su esfuerzo, dedicación y ejemplo. Máxime cuando coinciden en la misma persona padre, jefe y maestro. Te lo debo todo. Muchas gracias.

Por último un agradecimiento muy especial para Isabel, a quien le dedico este trabajo. No podía ser de otra forma porque ella ha sido, es y será siempre mi principal apoyo, mi baluarte y la guardiana de mi felicidad. Sin tí no sería posible nada de lo que sucede en mi vida, porque tú eres mi todo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Marco conceptual. La inflamación en el origen de la patología vascular	6
1.1. Arteriopatía obstructiva	7
1.2. Hiperplasia intimal	13
1.3. Aneurismas arteriales	18
2. Bases conceptuales en terapia celular	26
2.1. Células madre y patología vascular	34
3. Modelos experimentales	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
1. Primera fase	39
2. Segunda fase	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
1. Primera fase	41
1.1. Diseño Experimental	41
1.2. Aislamiento, cultivo, crecimiento, caracterización, transfección y diferenciación celular	41
1.3. Intervención Quirúrgica	48
1.4. Seguimiento	54
1.5. Estudio Histológico	54
2. Segunda fase	57
2.1. Diseño experimental	57
2.3. Aislamiento, cultivo, crecimiento, caracterización y localización celular	57
2.4. Intervención Quirúrgica	58
2.5. Seguimiento	59
2.6. Estudio Histológico	60
RESULTADOS	62

1. Primera fase	63
1.1. Caracterización y diferenciación celular	63
1.2. Estudio Macroscópico	64
1.3. Estudio Histológico	67
2. Segunda fase	69
2.1 Estudio Macroscópico	70
2.2 Pruebas de imagen (CT y Eco Doppler)	77
2.3 Estudio Histológico	80
2.4 Localización de las células troncales	89
DISCUSIÓN	93
1. Modelo experimental	94
2. Supervivencia celular	96
3. Efectos de las células troncales mesenquimales y posible aplicación clínica	97
2. Perspectivas de futuro	103
CONCLUSIONES	105
LIMITACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	109

ABREVIATURAS

AAA: Aneurisma de Aorta Abdominal

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AP-1: Apoproteína 1.

ARS: Tinción de Alizarina Roja S.

ASC: Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo.

BMP-2: Proteína morfogenética 2.

CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.

CPE: Células Progenitoras Endoteliales.

CT: Tomografía computadorizada.

DAPI: Diamin fenilindol (inmunofluorescencia azul).

DMEM: Medio *Eagle* Modificado por Dulbecco.

ESCs: Células madre embrionarias.

EVAR: Reparación aórtica endovascular.

FBS: Suero Fetal Bovino.

FGF: Factores de Crecimiento Fibroblástico.

FISH: Hibridación fluorescente in situ.

GVDH: Enfermedad injerto contra huésped.

HDL: Colesterol de alta densidad.

HGF: Factor de crecimiento hepático.

HSC: Células madre hematopoyéticas.

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1.

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina.

IL: Interleukina.

IMF: Intensidad de fluorescencia.

IPS: Células pluripotentes inducidas.

LDL: Colesterol de baja densidad.

MMP: Metaloproteasas.

MSC: Células Troncales Mesenquimales

NF-KB: Factor de necrosis KB.

PAS: Tinción de ácido periódico de Schiff.

PBS: Tampón salino fosfato.

PDGF: Factores de crecimiento plaquetarios.

SMC: Células Musculares Lisas.

SR-A: Receptores tipo *scavenger* A.

SVF: Fracción Vásculo Estromal.

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β .

UTC: Unidad de Terapia Celular.

VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular 1.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo cardiovascular.

Tabla 2. Clasificación de los aneurismas.

Tabla 3. Muestra de la primera fase del estudio. *Endoprótesis corta. Fuga tipo I distal con salida de fibrina a la bifurcación aórtica. PMN: Polimorfonucleares. Circunf: disposición circunferencial. WG: wallgraft (tamaño).

Tabla 4. Grupo no previsto de sacrificio a las 24h. Tres casos tratados con células. *Endoprótesis descolgada hacia la bifurcación iliaca. **Endoprótesis corta. Fuga tipo I distal con salida de fibrina a la bifurcación aórtica. **Infl Aguda:** Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. **Infl Crónica:** Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. **Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño:** presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Tabla 5. Grupo no previsto de sacrificio a la semana. En rojo control sin células y en negro animal tratado con células. *Posible embolización de fibrina con trombosis arterial subaguda de eje iliacofemoral derecho. **Infl Aguda:** Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. **Infl Crónica:** Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. **Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño:** presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Tabla 6. Grupo 1. Sacrificio al mes. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células. **Infl Aguda:** Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. **Infl Crónica:** Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. **Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño:** presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Tabla 7. Grupo 2. Sacrificio a los dos meses. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células. **Infl Aguda:** Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. **Infl Crónica:** Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. **Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño:** presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Tabla 8. Grupo 3. Sacrificio a los tres meses. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células. *Pielonefritis detectada en el CT y necropsia, sin correlato clínico. **Infl Aguda:** Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. **Infl Crónica:** Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. **Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño:** presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared de arteria elástica normal. (A) Se advierte la disposición circular de la capa media. Tricrómico de Masson, 10x. (B) Disposición de las fibras elásticas. Con mayor intensidad festoneada y de manera completa la lamina elástica interna. Orceína, 40x.

Figura 2. Corte transversal de la pared de un aneurisma de aorta abdominal. Nótese la presencia de trombosis mural, la desestructuración completa del endotelio y capa media con vasos neoformados y focos de infiltración mononuclear sugestivos de una inflamación crónica, así como la relativa preservación de la adventicia. Hematoxilina-eosina x4.

Figura 3. Clasificación de las células madre según capacidad de diferenciación.

Figura 4. Estructura del tejido graso. (A) Fracción estromal. (B) Adipocitos. Hematoxilina-eosina x100.

Figura 5. Células recién aisladas (4 horas en cultivo) y en subconfluencia (10 días en cultivo).

Figura 6. Intubación en decúbito prono. Con los animales de mayor seguimiento esta maniobra podía ser dificultosa debido al tamaño que alcanza el animal (en la imagen, caso de 3 meses de esguimiento, 84kg de peso)

Figura 7. Imagen quirúrgica del aneurisma doble una vez suturado a la aorta. Sobre la bifurcación iliaca se anastomosa un tubo recto de dacron para el acceso de la endoprótesis sin dañar las arterias nativas.

Figura 8. Imagen de escopia durante el procedimiento. Los extremos del aneurisma se marcan con mosquitos para ajustar perfectamente la endoprótesis y evitar complicaciones durante su liberación.

Figuras 9-11. Imágenes macroscópicas de la pieza donde se aprecia la disposición fusiforme del aneurisma doble. Corte transversal del aneurisma una vez extraída la endoprótesis, donde se aprecia el saco del aneurisma relleno de un tejido de consistencia elástica.

Figura 12. CT de seguimiento. Anestesia inhalatoria

Figura 13. Citometría de flujo. Marcadores expresados por nuestras ASCs

Figura 14. Diferenciación adipogénica. (A) Control. (B) Medio adipogénico (18 días).

Figura 15. Diferenciación osteogénica. (A) Control. (B) Medio osteogénico (32 días).

Figura 16. Fibrosis retroperitoneal sobre el parche de dacron.

Figura 17. Aneurisma tratado. (A) Pared arterial tratada con células madre con el parche de Dacron. Presenta cambios regenerativos y una inflamación linfocitaria leve. Hematoxilina-eosina x4. (B) Aneurisma control sin células madre. Presenta cambios regenerativos y un gran infiltrado inflamatorio linfocitario. Hematoxilina-eosina x4. (C) Aneurisma control. Abundante celularidad linfocitaria con un recuento de 420 linfocitos por campo de gran aumento. Hematoxilina-eosina x40. (D) Aneurisma tratado con células madre. Reacción linfocitaria menor con un recuento de 70 linfocitos por campo de gran aumento. Hematoxilina-eosina x40.

Figura 18. Inmunofluorescencia frente a GFP (en verde) y marcaje con DAPI (azul) de los núcleos celulares. (A) Disposición de las células implantadas a 3 semanas bordeando el saco aneurismático (x10). (B) Ampliación de la región central de la foto A donde observamos 2 células GFP positivas (x100).

Figura 19. Presencia de células reparativas fusiformes de disposición concéntrica en la capa media neoformada, adyacente al parche de Dacron en la pared de un vaso tratado con células troncales mesenquimales. (A) Hematoxilina eosina x20. (B) Hematoxilina eosina x4.

Figura 20. Grupo 1. Sacrificio al mes. Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas. Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-trombo. Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 21. Grupo 2. Sacrificio a los dos meses. Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas. Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-

trombo. Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 22. Grupo 3. Sacrificio a los tres meses. Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas. Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-trombo. Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 23. Pielonefritis y anulación de la función de un riñón en relación con la intervención, por posible infección relacionada con el parche protésico.

Figura 24. CT en tres planos y reconstrucciones tridimensionales de la endoprótesis..

Figura 25. Eco doppler intraoperatorio (pre-sacrificio).

Figura 26. Hemorragia-Trombo. Animales tratados con células troncales mesenquimales. (A) Un día de seguimiento: hemorragia en la luz arterial, fibrina y presencia de células inflamatorias. Hematoxilina eosina x40. (B) Una semana de seguimiento: formación de trombo con fibrina. Hematoxilina eosina x40. (C) Un mes de seguimiento: trombo con neoformación vascular. Hematoxilina eosina x40. (D) Dos meses de seguimiento: desaparición del trombo y sustitución por fibrosis. Hematoxilina eosina x20.

Figura 27. Gráfico que representa la presencia de Hemorragia-Trombosis en los grupos de tratamiento.

Figura 28. Gráfico que representa la presencia de necrosis tanto en los casos como en los controles.

Figura 29. Gráficos donde se expresa la valoración histológica ciega de la inflamación en los casos y los controles (expresado en datos acumulativos). Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares. Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas. (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 30. Comparación del patrón inflamatorio agudo entre casos tratados y no tratados con células troncales mesenquimales. Se observa como en los casos

tratados existe un infiltrado de predominio polimorfonuclear que disminuye notablemente a partir del primer mes de seguimiento en comparación con los controles. A los dos meses de seguimiento se observa una neoformación de vasos acompañada de la desaparición de la celularidad inflamatoria aguda. En los controles no tratados esta neoformación es menor y se observan todavía fenómenos inflamatorios agudos. Hematoxilina eosina (diferentes aumentos).

Figura 31. Comparación del proceso de inflamación crónica entre casos tratados con células troncales mesenquimales y controles. La celularidad inflamatoria mononuclear linfoide aparece más temprano y con más intensidad en los casos que en los controles. Se observa que en el seguimiento a un mes la mayor parte de las células de los controles son polimorfonucleares, mientras que en los casos predomina una celularidad linfoide. A medida que aumenta el periodo de seguimiento disminuye el proceso inflamatorio en los animales tratados con células mientras que en los controles el infiltrado inflamatorio crónico aumenta significativamente. Hematoxilina eosina x20.

Figura 32. Gráfico que representa la presencia de Hemosiderosis (reacción a cuerpo extraño) y la neovascularización del saco aneurismático.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas. (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 33. Gráfico donde se aprecia la evolución hacia una mayor fibrosis del saco aneurismático tratado con células troncales mesenquimales. Porcentaje de tejido fibrótico (1= \leq 25%; 2=25-75%; 3= \geq 75%).

Figura 34. Hematoxilina eosina 40x-100x. Presencia de calcio en los controles no tratados con células troncales en dos y tres meses de seguimiento (A y C) que no aparece en los casos tratados en esos mismos periodos de tiempo (B y D).

Figura 35. Gráfico donde se aprecia la presencia de calcio como indicador inflamatorio en los controles, que no aparece en los casos tratados con células troncales.

Figura 36. Control sin células a los dos (A) y tres (C) meses de seguimiento, no se aprecia la existencia de lámina elástica interna, que sí puede verse en los

casos tratados con células troncales a los dos meses (B) y a los tres meses de seguimiento (D). Hematoxilina eosina 40x.

Figura 37. Gráfico donde se aprecia la presencia de lámina elástica interna sólo en los casos tratados con células madre y no en los controles.

Figura 38. FISH en 24h de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

Figura 39. FISH en una semana de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

Figura 40. FISH en un mes de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

Figura 41. FISH en dos meses de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

Figura 42. FISH en tres meses de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El tratamiento endovascular de los aneurismas de aorta abdominal es mejor tolerado que el quirúrgico pero tiene el inconveniente de que no trata la inflamación de la pared del aneurisma (que se encuentra en el trasfondo de la fisiopatología) y de que no elimina completamente el riesgo de rotura del aneurisma tratado.

OBJETIVO: Valorar la posibilidad de rellenar el saco aneurismático tratado mediante endoprótesis con un tejido vivo a partir de células troncales mesenquimales.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se realiza un modelo porcino experimental en 20 animales a los que se les crea un aneurisma artificial con un parche de Dacron y se les trata mediante endoprótesis que aísla un saco aneurismático donde se introducen células troncales mesenquimales alogénicas de la grasa. Se realiza un seguimiento variable de hasta tres meses. El experimento se plantea en dos fases y se estudian variables histológicas por un observador ciego y técnicas de detección de las células implantadas (inmunofluorescencia, detección del cromosoma Y). También se realizaron pruebas de imagen mediante CT y eco doppler en el seguimiento.

RESULTADOS: Primera Fase: Se demuestra la viabilidad y reproducibilidad del modelo experimental así como la supervivencia de las células madre mesenquimales un mínimo de tres semanas. Segunda Fase: Se demuestra la supervivencia de la estirpe celular a los tres meses de seguimiento y se encuentran cambios histológicos en el grupo tratado que no se aprecian en el grupo control. Los casos presentan un menor grado de inflamación aguda y crónica, una mayor fibrosis del saco aneurismático y una regeneración de la capa elástica interna de la arteria. No encontramos cambios macroscópicos en el sacrificio ni en las pruebas de imagen realizadas en esta segunda fase (CT y eco doppler).

CONCLUSIONES: El tratamiento combinado endovascular y celular de los aneurismas de aorta abdominal muestran unos resultados prometedores en lo concerniente a la estabilización del saco aneurismático, al conseguir crear en él un tejido vivo que afianza la endoprótesis e incluso muestra signos de regeneración de la pared arterial en el estudio histológico.

INTRODUCCIÓN

La Angiología tiene por objeto el estudio del sistema que asegura la circulación de la sangre, el quilo y la linfa. Desde William Harvey se sabe que la sangre circula por el organismo a partir del ventrículo izquierdo, desde donde la aorta distribuye entre el resto de arterias del cuerpo la sangre oxigenada, a excepción de los pulmones¹.

La organización básica de la pared de todas las arterias es similar. Se pueden distinguir tres capas concéntricas: 1) una capa interna o *túnica íntima*, que forma un tubo endotelial cuyas células escamosas tienen su eje mayor orientado longitudinalmente; 2) una capa intermedia o *túnica media* compuesta principalmente por células musculares lisas (SMC) dispuestas circularmente; y 3) una capa externa o *túnica adventicia* constituida por fibroblastos y fibras colágenas asociadas que están orientadas en su mayor parte de forma longitudinal. Los límites entre las capas los marcan dos láminas elásticas interna y externa. En función de su tamaño podemos hablar de las arterias elásticas (grandes), de distribución (musculares) y arteriolas. Nos fijaremos en las primeras que serán objeto de nuestro estudio (fig. 1)

Las grandes arterias elásticas como la aorta, poseen muchas capas fenestradas de elastina en su túnica media, que les da el aspecto amarillo a la inspección quirúrgica. Durante la sístole cardíaca se distienden y durante la diástole sirven con su recuperación elástica de bomba subsidiaria para mantener un flujo laminar continuo a pesar del carácter intermitente del latido cardíaco.

El endotelio proporciona al vaso una capa de revestimiento lisa y una barrera parcialmente selectiva de difusión entre la sangre y las capas más externas del vaso. Es una población celular de renovación muy lenta.

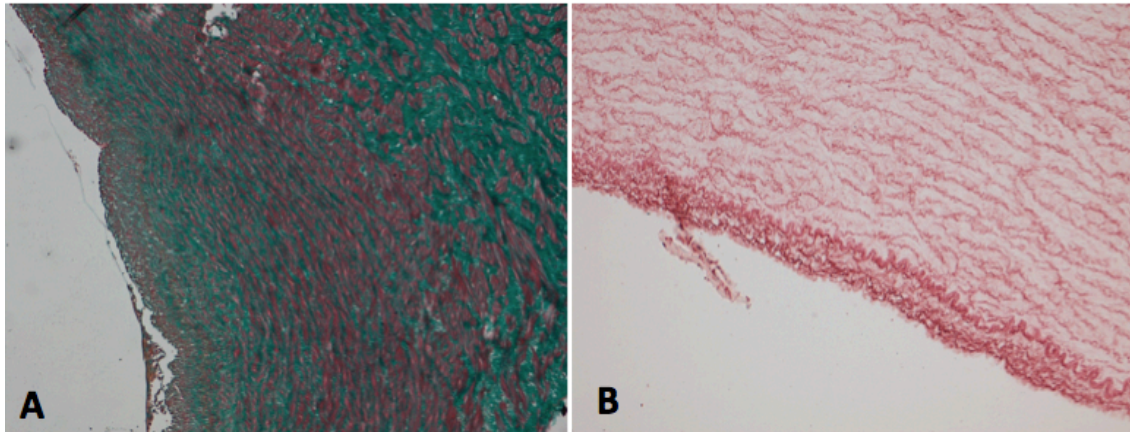


Figura 1. Pared de arteria elástica normal. (A) Se advierte la disposición circular de la capa media. Tricrómico de Masson, 10x. (B) Disposición de las fibras elásticas . Con mayor intensidad festoneada y de manera completa la lamina elástica interna. Orceína, 40x.

La túnica media de las arterias elásticas está formada por múltiples y concéntricas láminas de elastina alternadas con láminas de células musculares lisas orientadas circularmente y fibras de colágeno en una matriz extracelular de proteoglucano.

La adventicia esta constituida por fibroblastos, haces longitudinales de fibras colágenas y una red laxa de fibras elásticas finas.

Las paredes de las grandes arterias experimentan un proceso gradual de crecimiento y desarrollo desde el nacimiento hasta aproximadamente los 25 años de edad. Se produce un engrosamiento progresivo de la pared y un aumento relativo de la cantidad de colágeno y proteoglucanos, que condiciona una disminución progresiva de la flexibilidad de las arterias elásticas (*arterioesclerosis* o endurecimiento de las arterias). Los cambios más significativos se producen en la íntima, con la acumulación de componentes de la matriz extracelular y en la media, con disminución progresiva de las células musculares lisas².

Las grandes arterias son más sensibles al desarrollo de aterosclerosis, que se caracteriza por engrosamientos irregulares de la íntima, que contienen depósitos intracelulares y extracelulares de lípidos.

1. Marco conceptual. La inflamación en el origen de la patología vascular

Según la OMS, con el aumento de la esperanza de vida y la generalización de los factores de riesgo cardiovascular, cada vez cobran más importancia las enfermedades cardiovasculares, que son la primera causa de muerte del mundo occidental³.

La patología arterial tiene un denominador común que es la inflamación que se produce en sus paredes en respuesta a diferentes noxas. Esta respuesta se puede traducir en el acúmulo de sustancias y productos de degradación en la región subendotelial (patología obstructiva, hiperplasia intimal) o en la degradación y debilitamiento de la pared que se acaba dilatando (aneurismas). Diferentes estudios explican las bases y mecanismos de este proceso inflamatorio, y aunque no se conocen con exactitud los eventos que inician o regulan el proceso, sí sabemos ya que las células progenitoras endoteliales juegan un papel que parece crucial en los procesos de reparación y “cicatrización” de las lesiones inducidas en la pared arterial.

Existe una fisiopatología común de la enfermedad arterial, sea cual sea el órgano principal afectado (cardiología, neurología, cirugía vascular periférica...). El tratamiento médico será muy parecido y persigue el mismo objetivo en todas las especialidades: el control del proceso inflamatorio que se produce en la pared arterial.

Este trabajo pretende profundizar en el conocimiento del papel que pueden tener las células progenitoras de estirpe mesenquimal, procedentes de la Fracción Vásculo-Estromal (SVF) del tejido graso en el proceso de reparación de una lesión arterial.

Como se ha mencionado antes, la respuesta del árbol arterial a una agresión (no siempre conocida) puede ser de tres formas: la arteriopatía obstructiva (en respuesta a diversos factores de riesgo cardiovascular), la hiperplasia intimal (en

respuesta a la cirugía) y la formación de aneurismas (en respuesta a diversos factores, no del todo conocidos)

1.1 Arteriopatía obstructiva.

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta a las arterias medianas y grandes en la que se acumula grasa y tejido fibroso en la capa íntima (placa de ateroma). En 1904 Marchand introduce el término aterosclerosis al reconocer la invariable asociación de la degeneración grasa con el endurecimiento de las arterias. El avance en el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad ha generado el concepto de los factores de riesgo cardiovascular, sobretudo a raíz del estudio *Framingham*⁴. Estudios de autopsia como el *Bogdals Heart Study* o el *Photobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth* han demostrado que el proceso de aterogénesis puede comenzar durante la infancia y progresar con la edad^{5,6}.

La interacción de los factores de riesgo con la pared arterial inicia el proceso de formación de la placa de ateroma. El punto de partida inicial podría ser la disfunción endotelial, también llamada fase de “activación”, puesto que las células endoteliales responden ante el estímulo nocivo. Existen tres teorías respecto del origen de la aterosclerosis: La hipótesis lipídica (el exceso de colesterol iniciaría el proceso subendotelial), avalada por el efecto beneficioso de la terapia hipolipemiente⁷. La hipótesis de respuesta al daño endotelial (una solución de continuidad en el endotelio u otra agresión como infecciones, tóxicos o señales proinflamatorias endógenas desencadenarían los mecanismos inflamatorios de respuesta)⁸ y la teoría monoclonal (genética, cada lesión sería debida a un crecimiento clonal de un sólo precursor de célula muscular lisa subintimal)⁹

Las principales causas de la disfunción endotelial son las alteraciones hemodinámicas, la hipercolesterolemia y la inflamación. Estas tres noxas actúan provocando un aumento de la permeabilidad endotelial, oxidación y acumulación

del colesterol de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial. Este LDL oxidado tiene un potente efecto proinflamatorio y proaterogénico¹⁰. La formación de productos derivados de la oxidación y de radicales libres de oxígeno estimulan la expresión de moléculas de adhesión e inician el proceso inflamatorio. La activación de la célula endotelial da lugar a la producción por parte de ésta de factores de crecimiento y quimiotácticos que atraen y favorecen la proliferación de macrófagos circulantes y de las células musculares lisas de la pared arterial^{11,12}.

La arterioesclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica.

El proceso de formación de la placa de ateroma se podría resumir en los siguientes pasos:

1º) Entrada al espacio subendotelial de colesterol LDL.

Probablemente el paso del LDL circulante al espacio subendotelial se deba a un gradiente de concentraciones y a una cierta permeabilidad del endotelio. Si la íntima no está lesionada, lo normal es que ese LDL no quede retenido en el espacio subendotelial y vuelva al torrente sanguíneo o se degrade in situ. Sin embargo, cuando se altera el balance entre la entrada y salida del LDL y se produce una interacción con los macrófagos, se deposita en la matriz extracelular y se oxida. Una vez oxidado, el LDL se convierte en un potente quimiotáctico para los monocitos¹³.

2º) Activación de los monocitos.

La oxidación del LDL y la formación de radicales libres de oxígeno activan la expresión de proteínas como el factor nuclear KB (NF-KB) que induce la expresión de moléculas de adhesión. Las moléculas de adhesión interaccionan con los leucocitos, sobretudo monocitos y linfocitos. En el proceso de la aterosclerosis se ha visto que se expresan especialmente las moléculas de

adhesión VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*) y la ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule*), que fijan de manera más estable las células inflamatorias, que enseguida migran al espacio subendotelial¹⁴.

3º) Macrófagos y otras células inflamatorias.

Una vez situados en el espacio subendotelial, los monocitos experimentan una serie de cambios fenotípicos y se transforman en macrófagos residentes que atrapan el LDL oxidado mediante receptores tipo scavenger A (SR-A) y CD36, y se transforman en células espumosas. Aunque la mayoría de estas células son en origen macrófagos activados, las células musculares lisas de la túnica media también pueden capturar LDL oxidado por los mismos mecanismos y receptores. Los macrófagos activados secretan citocinas, proteasas y moléculas vasoactivas. De ellas, son especialmente importantes la familia de las metaloproteasas (MMP-1, MMP-3 y MMP-9) que degradan la matriz extracelular, favoreciendo la inestabilidad de la placa.

Otras células inflamatorias como linfocitos T y mastocitos también se encuentran en la placa de ateroma¹⁵. Los linfocitos T, que pueden llegar a suponer el 10-20% de la población leucocitaria de la placa en lesiones avanzadas, expresan marcadores de inflamación crónica, son de origen policlonal (respuesta a varios estímulos, no sólo a uno) y fabrican interferón γ , que a su vez estimula la expresión de los antígenos de histocompatibilidad tipo II. Los mastocitos se localizan preferentemente en las zonas de ruptura de la placa, y podrían tener un papel importante en este hecho.

4º) Activación plaquetaria y del complemento.

En los lugares de erosión de la placa se adhieren las plaquetas, que son capaces de secretar factores de crecimiento (PDGF) y otras sustancias vasoactivas que retienen y colaboran en la activación del resto de células inflamatorias y musculares lisas, promoviendo la formación de células espumosas.

Las partículas de colesterol son un potente activador del complemento. La activación del complemento parece tener un papel importante en la iniciación del proceso aterosclerótico y en la progresión de la enfermedad. La activación ocurre tanto por la vía clásica (anticuerpos) como por la alternativa (independiente de anticuerpos).

5º) Células musculares lisas.

Los mediadores proinflamatorios estimulan la proliferación, activación y migración de las células musculares lisas desde la túnica media a la íntima. Allí son capaces de secretar PDGF, factores de crecimiento fibroblástico y TGF- β . Así se estimula la producción de la matriz de colágeno del espacio subendotelial, rica no sólo en colágeno, sino también en elastina y proteoglicanos. A medida que la placa madura, se acumulan más células espumosas cargadas de colesterol en un manto fibroso de colágeno en el espacio subendotelial.

6º) Calcificación.

Moléculas de la familia del TGF- β , y más concretamente la BMP-2 (proteína morfogenética 2) y el fosfato inorgánico inducen el cambio fenotípico osteocondrogénico de las células musculares lisas, haciendo que éstas acumulen calcio en la zona de la placa de ateroma¹⁶. A medida que todo este proceso se perpetúa la placa de ateroma aumenta de tamaño y poco a poco se convierte en una placa vulnerable. La placa vulnerable es una lesión histológica

avanzada, con un gran núcleo lipídico, rodeada de una fina capa fibrótica, ulceración, trombosis y hemorragia intraplaca, en el contexto de una intensa infiltración por células inflamatorias. La ruptura de la placa se producirá primero en aquellas zonas con mayor estrés hemodinámico.

Factores de riesgo Cardiovascular.

La *American Heart Association* clasificó los factores de riesgo cardiovascular en 1999¹⁷ en tres categorías (Tabla 1): factores tradicionales-convencionales, que tienen un papel directo en la aterogénesis, factores predisponentes, que aun teniendo efectos independientes sobretodo potencian el riesgo de los convencionales y factores condicionales (no bien documentados, pero parece que aumentan el riesgo en presencia de otros factores) .

F. Convencionales	F. Predisponentes	F. Condicionales
Tabaco	Edad avanzada	Homocisteína
Diabetes mellitus	Obesidad	Proteína C Reactiva
Hiperlipidemia	Inactividad física	Fibrinógeno
Hipertensión	Género	Metaloproteasas
	Historia familiar/genética	Infecciones
	Factores socioeconómicos	Hipercoagulabilidad
		Otros marcadores infl. (amiloide A, citocinas...)
		Adipoquinas
		Leptina
		Creatinina, urato
		Células Prog. Endoteliales
		Estrés oxidativo

Tabla 1. Factores de riesgo cardiovascular.

Factores oponentes de la aterogénesis

La mayoría de los estudios sobre aterogénesis se han focalizado en los factores de riesgo, pero también hay muchos estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales que demuestran el papel protector de otros factores.

El *colesterol de alta densidad* (HDL) interrumpe el proceso de aterogénesis en varios puntos clave. Participa en el aclaramiento del colesterol de las células espumosas inhibiendo la oxidación del LDL y limitando la respuesta inflamatoria. También tiene capacidad antitrombótica. El HDL colabora también en el transporte inverso del colesterol, desde el vaso al hígado¹⁸.

El *activador tisular del plasminógeno* es una molécula producida por la célula endotelial que induce fibrinólisis, reduciendo el crecimiento del trombo dentro del vaso.

La enzima *superóxido dismutasa intracelular* detoxifica los radicales libres de oxígeno intracelular.

El *óxido nítrico* y las *prostaciclinas* derivadas del endotelio también inhiben la progresión de la placa, son vasodilatadores e inhiben la adhesión de los leucocitos y las plaquetas al endotelio. Además, son capaces de inhibir la proliferación de las células musculares lisas y los macrófagos, suprimiendo la generación de radicales libres de oxígeno.

La *adiponectina*, el péptido hormonal más secretado por los adipocitos, aumenta la sensibilidad a la insulina por parte del hígado y del músculo esquelético, favorece la oxidación de ácidos grasos, inhibe la interacción monocito-endotelio, estimula el crecimiento de las células endoteliales, disminuye la presión arterial y modera el crecimiento del tejido graso.

Células Progenitoras

Las células mesenquimales (también llamadas estromales) de la médula ósea tienen una potencial diferenciación hacia células musculares lisas y endoteliales¹⁹. Recientemente ha aumentado el interés por estas células, puesto que pueden contribuir significativamente al proceso de reparación vascular, neoangiogénesis, respuesta inflamatoria y estabilización de la lesión^{20,21}.

El cambio en la población de células progenitoras endoteliales (CPE) (movilización endógena o administración exógena) es un nuevo método de modulación del equilibrio entre daño y reparación. Son un nuevo predictor de morbimortalidad cardiovascular. La cantidad de CPE se correlaciona bien con la función endotelial y es inversamente proporcional a los factores de riesgo de aterosclerosis. Además, la vasculoprotección derivada del uso de estatinas, estrógenos y la actividad física podría estar mediada por las CPE^{22,23,24,25,26,27}. Estos últimos estudios sobre la acción de las estatinas^{28,29} confirman lo que ya decían otros autores³⁰ desde hace tiempo, y es que la placa de ateroma es algo dinámico, que no sólo progresa sino que también puede regresar si se maneja adecuadamente el equilibrio daño-reparación.

1.2 Hiperplasia Intimal.

La hiperplasia intimal describe el cambio estructural que ocurre en lesiones arteriales, bypasses protésicos y venas arterializadas. Se trata de la migración y proliferación anómala de las células musculares lisas de la túnica media del vaso (SMC) hacia la región subendotelial, donde favorecen el depósito de una neo-matriz extracelular de tejido conectivo provocando de la remodelación del vaso agredido.

Se ha visto que la población de células musculares lisas crece del 1% al 20% 48 horas después de una angioplastia experimental. Esta primera fase de respuesta parece mediada por *Factores de Crecimiento Fibroblástico* (FGF) liberados por las células lesionadas y muertas tras la agresión quirúrgica. De esta forma,

cuanto mayor es el daño de la pared del vaso, mayor es la respuesta. Durante las dos semanas siguientes sigue aumentando y migrando la población subendotelial de SMC. Cuatro semanas después, la respuesta proliferativa de la capa media vuelve a niveles basales.

La migración está mediada en parte por factores de crecimiento plaquetario (PDGF) y no se afecta por fármacos antimitóticos ni por radiaciones. Una vez en la íntima, el 50% de las SMC proliferan y secretan proteasas y matriz extracelular. Esta secreción se controla de manera importante por el *factor de crecimiento de transformación beta* (TGF- β), pero esta segunda fase de proliferación no está bien caracterizada. El espesor de la hiperplasia intimal alcanza su pico durante el primer mes, y su crecimiento rápido se debe por un lado a la proliferación celular y por otro a la síntesis de proteoglicanos por parte de ellas.

Asociados a estos cambios intinales y de la túnica media se producen también cambios en la adventicia. Existe una importante proliferación celular y secreción de factores de crecimiento. Se puede apreciar una infiltración de miofibroblastos al segundo día de la intervención, que dos semanas después pueden representar el 50% de la población celular de la íntima. Los miofibroblastos producen la contracción de la cicatriz, que en el caso de los vasos sanguíneos puede llevar a una pérdida elástica del diámetro de la luz, no mediado solamente por el espesor de la neoíntima.

Todo este proceso de activación, migración, síntesis de matriz extracelular, contracción, etc. está mediado por infinidad de factores de crecimiento, citocinas, proteasas, activadores del plasminógeno, metaloproteasas, angiotensina y otros, que se relacionan en complejas cascadas de activación y gradientes.

La situación hemodinámica influye mucho en la aparición de la hiperplasia intimal. Por ejemplo, en las zonas tratadas mediante angioplastia se desarrolla más hiperplasia cuanto peor es el *run-off* y mayor engrosamiento de la capa

media cuanto mayor es la deformación de la pared del vaso (dilatación del balón de angioplastia).^{31,32}

Otros factores que afectan al desarrollo de la hiperplasia son la hiperlipidemia³³ y la diabetes³⁴ o el tabaquismo³⁵. Se produce tres veces más depósito de ésteres de colesterol en las zonas de endotelio dañando que en el íntegro, lo cual sugiere que el daño endotelial provoca la síntesis de variantes de proteoglicanos con mayor afinidad por el LDL. Además, el tratamiento con estatinas parece disminuir la formación de hiperplasia intimal³⁶.

Respuesta al bypass.

Entre los 5 y los 24 días del implante de prótesis de politetrafluoroetileno expandido (PTFE) las anastomosis se recubren de una fina capa de fibrina y glóbulos rojos atrapados en ella, que con el paso de los meses sirve de anclaje para una capa de células endoteliales que recubre toda la superficie interna de la prótesis (11-48 meses). También entonces se pueden ver macrófagos y colágeno como parte de una hiperplasia intimal incipiente, que se puede mantener relativamente estable más tiempo o seguir proliferando hasta la oclusión de la luz, preferentemente en las anastomosis. No existe evidencia de que la capa endotelial sea capaz de recubrir toda la superficie de un bypass³⁷. Más bien la endotelización se produce en las zonas cercanas a las anastomosis.

La formación del neoendotelio se puede producir por dos mecanismos, la migración transmural (dependiente del grado de porosidad del material) y el crecimiento por contigüidad desde las anastomosis. Por ello sólo se verá neoendotelio en las zonas cercanas a las anastomosis en los materiales menos porosos y en todo el recorrido del bypass en los más porosos³⁸. La neoíntima de una prótesis presenta una mayor cantidad de matriz extracelular que una lesión arterial equivalente.

En la zona de la anastomosis no sólo proliferan las células endoteliales, sino también las células musculares lisas, que fabrican el sustrato sobre el que el endotelio se asienta. La línea de sutura de la anastomosis es el lugar donde más crecen estas células (máxima reacción inflamatoria, con expresión de todos los factores mencionados antes) y por lo tanto es el lugar que siempre se aprecia más engrosado en los estudios macro y microscópicos³⁹.

En los bypasses venosos la hiperplasia se centra principalmente en las anastomosis, ya que en el resto del trayecto existe un endotelio no dañado y una pared de vaso estructuralmente normal, en el que proliferará su capa media en respuesta a su nueva situación hemodinámica hasta la arterialización del conducto.

La hemodinámica juega un papel definitivo en la formación de la hiperplasia intimal de las anastomosis protésicas. En situaciones de alto flujo se produce capas de neoíntima mucho más finas que en condiciones de flujo menor⁴⁰.

Respuesta a los stents endoluminales.

La respuesta a estos dispositivos depende de su diseño, longitud, material, sistema de liberación y técnica de liberación empleada. Hay cuatro tipos de reestenosis intrastent: I focal (<10mm de longitud), II difusa (>10mm), III proliferativa (>10mm y sobrepasando los límites del stent) y IV oclusión⁴¹.

Después de la colocación de un stent se elimina el remodelado elástico, pero se añade la formación de trombo en la malla del stent. Más tarde se forma la hiperplasia endotelial, que es el principal hecho contribuyente de la reestenosis. Tras la colocación de un stent, la malla de metal se recubre de una fina capa muy adherente de proteínas, sobretodo fibrina (recubrimiento que tiene lugar en unos 5-60 segundos), las celdas de los stents se rellenan de trombo y se atrapan células inflamatorias, que comienzan una reacción inflamatoria que será más duradera que tras una angioplastia aislada⁴². Esta respuesta es incluso más

acusada en el final del stent. Por otro lado no es infrecuente que la malla del stent atraviese el núcleo lipídico, lo cual provoca una mayor reacción adventicial.

Durante las dos semanas siguientes a la colocación del stent se produce la formación de una neoíntima que contiene células musculares lisas; a mayor daño sobre la capa media arterial (por ejemplo si se sobredimensiona el stent), mayor será la hiperplasia endotelial⁴³, factor fundamental en la evolución y su permeabilidad a corto y medio plazo.

Los stents con liberación de fármacos han aportado mejoras en los resultados: disminuyen la reestenosis al inhibir la proliferación de las células musculares lisas. Pero también disminuyen la proliferación, migración y liberación de factores tisulares por parte del endotelio, aumentando su potencial trombogénico⁴⁴. La presencia de un stent farmacoactivo también dificulta la proliferación, adherencia y diferenciación de las células progenitoras endoteliales (EPC), que podrían contribuir de manera importante a la reendotelización de los mismos⁴⁵.

Los stents recubiertos excluyen la placa de ateroma y al propio endotelio, lo que podría mitigar la pérdida luminal tardía al detener la migración y proliferación de células musculares lisas y células inflamatorias a través de la malla del stent. Esto podría reducir las reestenosis al limitar el depósito de matriz extracelular y por tanto de la temida hiperplasia intimal. Además los stents recubiertos permiten una sobredimensión mayor que los no recubiertos, al ser menos determinante en ellos la proliferación neointimal. Los stents recubiertos podrían tener también una menor trombogenicidad que los no recubiertos. Sin embargo, se ha comprobado que las reestenosis de los stents recubiertos se suelen dar en sus extremos, probablemente por la discordancia de rigidez de la arteria y del stent, así como por el daño endotelial del balón de angioplastia en estos extremos. Además, la progresión de la enfermedad arterioesclerosa más allá de los límites del stent puede justificar las reestenosis en estos puntos⁴⁶. Para

disminuir estas reestenosis se ha propuesto el uso de recubrimientos medicados (por ejemplo con heparina) y de transiciones entre stent y arteria más suaves⁴⁷.

Células progenitoras.

Es posible que las células-troncales mesenquimales (MSC), especialmente las procedentes de la médula ósea, se adhieran a la lesión y se diferencien en células musculares lisas (SMC). Cuando la lesión originaria es perivascular, se aprecian mucha menos cantidad de estas células, lo que invita a pensar que el mecanismo de producción de la lesión es crucial y que las MSC sólo actúan si el daño vascular es notable⁴⁸. No obstante es bien conocida la capacidad de las MSC de actuar en los procesos inflamatorios y de revascularización y su capacidad de secretar metaloproteinasas y diversos factores de crecimiento (GF) fundamentales para la reparación tisular.

Las células progenitoras del endotelio (EPC) se originan de los hemangioblastos y también pueden aislarse directamente de sangre periférica. Tienen capacidad de re-endotelizar lesiones vasculares extensas⁴⁹. En humanos, un número reducido de éstas se correlaciona bien con el riesgo cardiovascular y el pronóstico de la lesión⁵⁰. El número de EPC en sangre se afecta por los lípidos, estrógenos, eritropoyetina, ejercicio, el riesgo coronario y el cáncer.

Los pacientes diabéticos podrían tener una menor capacidad de reclutamiento de las EPC hacia el endotelio, y quizá de manera independiente de su perfil glucémico, lo cual podría ser una posible explicación al hecho de que estos pacientes estén más predispuestos a las reestenosis⁵¹.

1.3 Aneurismas arteriales

Se definen como una dilatación focal y persistente del diámetro de una arteria del 150% o más que el diámetro de la arteria adyacente no patológica.

Constituyen un problema de salud pública con una prevalencia del 9% en hombres y 1% en mujeres de edad superior a 65 años^{52,53} (Tabla 2).

CLASIFICACIONES DE LOS ANEURISMAS		
Anatómica	Fusiformes	
	Saculares	Verdaderos Falsos o Pseudoaneurismas
Etiológica	Degenerativos	Antes arterioesclerosos. Son los más frecuentes en la aorta abdominal. No hay diferencias moleculares con el inflamatorio.
	Conectivopatías	Takayasu Marfan Arteritis cel. gigantes Panarteritis nodosa Beçhet Cogan Ehlers-Danlos
	Disecantes	Se desarrollan después de una disección aórtica
	Traumáticos	Son pseudoaneurismas
	Infecciosos	
	Congénitos	Esclerosis tuberosa Post-coartación Lorey-Dietz
Anatómica	Aorta	Abdominal lo más frecuente (AAA)
	Iliaca	Asociados a los AAA

	Femoral	Sobretudo pseudoaneurismas iatrogénicos
	Poplítea	El segundo en frecuencia global después del AAA
	Visceral	Sobretudo esplénicos
	Miembro superior	Casi todos son pseudoaneurismas postraumáticos
	Carotideo	Verdaderos (raro) o pseudoaneurismas
	Cerebral	Habitualmente saculares

Tabla 2. Clasificación de los aneurismas.

El término “ateroesclerótico” es confuso ya que implica causalidad, y hay poca evidencia de que la degeneración aneurismática sea consecuencia directa de la aterosclerosis. Los aneurismas se forman aproximadamente en un 9-16% de los pacientes con aterosclerosis oclusiva sintomática⁵⁴. Incluso sabemos que la diabetes mellitus y un índice tobillo-brazo reducido son factores protectores frente al crecimiento de los aneurismas⁵⁵.

Hay evidencia de que el desarrollo de los aneurismas de aorta se asocia con la inflamación, la disfunción endotelial y la proteólisis, consecuencia de la disfunción de las proteasas y sus inhibidores en la pared arterial, que lleva a la destrucción de la túnica media⁵⁶ (fig. 2).

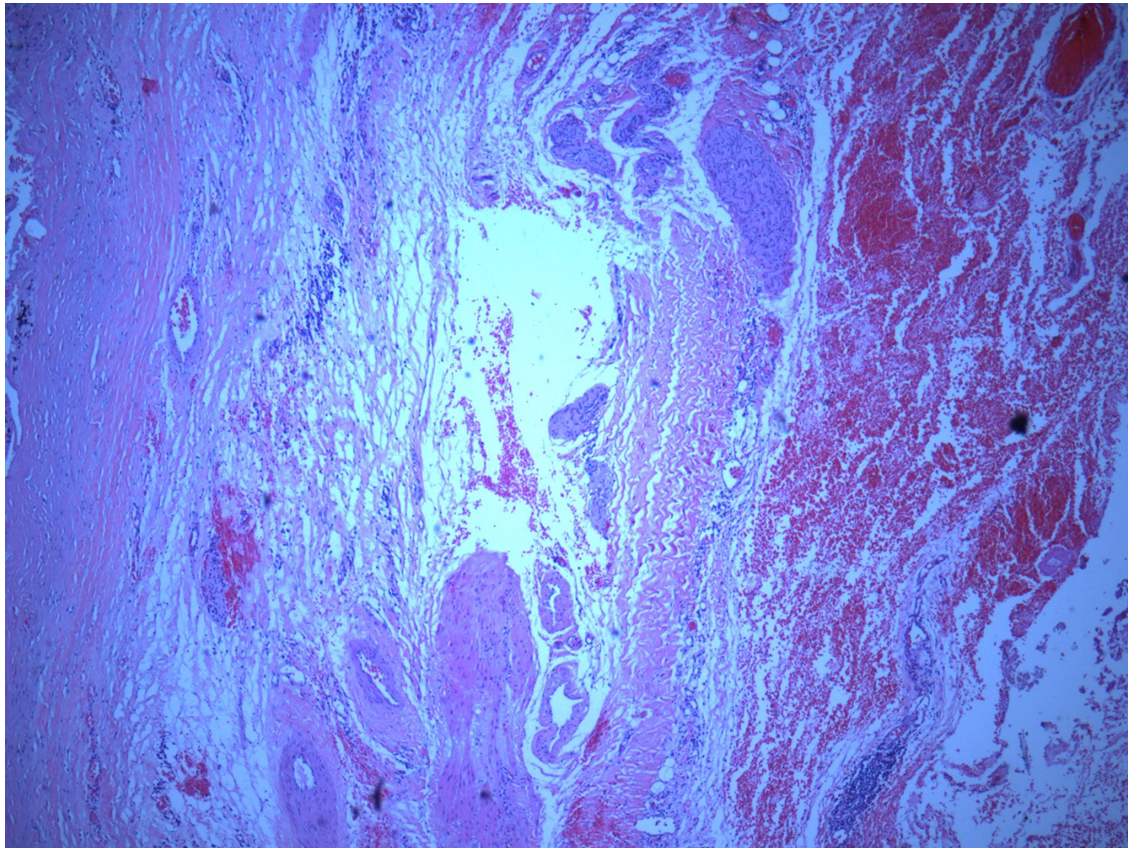


Figura 2. Corte transversal de la pared de un aneurisma de aorta abdominal. Nótese la presencia de trombosis mural, la desestructuración completa del endotelio y capa media con vasos neoformados y focos de infiltración mononuclear sugestivos de una inflamación crónica, así como la relativa preservación de la adventicia. Hematoxilina-eosina x4

Factores de Riesgo para el desarrollo de los aneurismas.

El tabaquismo, la historia familiar, la hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia y la presencia de patología arterioesclerótica como la patología coronaria son factores de riesgo conocidos para el desarrollo de los aneurismas⁵⁷. De ellos el más importante es el tabaquismo. La patología que se relaciona más estrechamente con el tabaquismo a excepción del cáncer de pulmón es el aneurisma de aorta abdominal (AAA).

Por otro lado, el género femenino, la raza afroamericana, la diabetes mellitus y el ejercicio regular son factores protectores frente a los aneurismas⁵⁸.

El crecimiento de los aneurismas de aorta se relaciona con el tamaño (los aneurismas mayores crecen más), el tabaquismo activo y la presencia de diabetes mellitus (crecen menos). Otros factores como la hipertensión, la dislipemia o la enfermedad arterial periférica no han demostrado su influencia en el crecimiento de los aneurismas.

La agregación familiar de los aneurismas aórticos abdominales es menor que en el caso de los aneurismas torácicos y tóracoabdominales⁵⁹. Sólo un 15% de los pacientes con AAA tienen una historia familiar relevante. Estos factores genéticos cada vez son más conocidos y estudios recientes han comprobado su relación con los procesos inflamatorios (gen de la interleuquina 10 y 15, factor de crecimiento beta, proteasas, etc.)⁶⁰.

Desafortunadamente aún no se conocen con exactitud cuáles son los verdaderos factores que hacen que una arteria degenera en aneurisma y no en una oclusión aterosclerótica, pero es posible que las células endoteliales jueguen un papel determinante mediante la producción de reactantes oxigenados. La reducción de las células musculares lisas de la túnica media durante los años en que se desarrollan los aneurismas también puede ser un factor importante. Se desconoce la secuencia exacta de sucesos que llevan a la progresión y rotura de un aneurisma pero lo que sugieren algunos estudios es que se produce una inflamación y proteólisis de la túnica media que provoca una reducción crítica en la resistencia tensil de la pared^{61,62}. También parece existir una relación entre la reducción de la vascularización de la adventicia y la formación de los aneurismas, aunque esto aún se discute.

Diferentes estudios clínicos y experimentales han demostrado que los primeros procesos responsables de la inflamación que causa la degeneración aneurismática de la pared arterial se deben a la activación de las vías del NF- κ B y AP-1⁶³, así como la hiperexpresión de IL-6 e IL-8 y la acumulación de neutrófilos. Todo esto provocaría una acumulación de linfocitos, mastocitos y macrófagos que secretarían varias proteasas sobre la pared arterial. Comprender mejor

estos procesos podría tener un papel determinante en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas^{64,65}.

Otros autores proponen la implicación del trombo intraluminal en la progresión y formación del aneurisma, que podría tener un papel directo activando la proteólisis mediada por metaloproteasas y plasmina. Esto contribuiría en una hipoxia de la túnica media con la consiguiente apoptosis-necrosis de las células musculares lisas. Tampoco está claro si el propio trombo puede aumentar la tensión de la pared del AAA^{66,67}.

La influencia de la hemodinámica en el riesgo de los aneurismas está demostrada tanto en estudios clínicos como experimentales⁶⁸. Por su situación anatómica, la aorta infrarrenal tiene una mayor resistencia periférica, un mayor estrés de su pared y un menor flujo en reposo que otros tramos de aorta. Estas condiciones hemodinámicas especiales la hacen ser más propensa a degenerar en aneurisma que otras arterias. La expresión de MMP-9 en la pared de la aorta infrarrenal es mayor que en segmentos proximales de aorta⁶⁹.

El ejercicio supervisado mejora la patología cardiovascular reduciendo los marcadores inflamatorios sistémicos y actualmente se está valorando si este mecanismo puede tener también un efecto saludable sobre la progresión de los aneurismas⁷⁰.

Mecanismos de proteólisis y degeneración de la túnica media.

La disolución de la matriz extracelular de la túnica media es una piedra angular en la fisiopatología de los aneurismas. Hay varias metaloproteasas implicadas en ello. Quizá una de las más específicas sea la MMP-9 o gelatinasa, capaz de degradar la elastina, el colágeno tipo I y IV y el fibrinógeno. Los niveles plasmáticos de MMP-9 están aumentados en los pacientes con AAA y en la pared del aneurisma se encuentra una mayor concentración de ésta, e incluso mayor cuanto mayor es el aneurisma⁷¹. Además, los niveles de MMP-9 disminuyen después del tratamiento quirúrgico o endovascular de los AAA⁷². Los

pacientes tratados mediante endoprótesis que mantienen elevados los niveles de MMP-9 puede que tengan mayor riesgo de desarrollar o mantener endofugas⁷³.

Aunque el origen exacto de la formación de un AAA sigue siendo desconocido, la inflamación parece ser el proceso fisiopatológico inicial. Los productos de degradación de la elastina estimulan y perpetúan la migración y activación de células mononucleares en la pared del aneurisma. Otras señales proinflamatorias provienen de la producción de radicales libres de oxígeno por los leucocitos, los fibroblastos y las propias células de la pared aórtica⁷⁴.

Tratamiento Endovascular

El manejo endovascular de los AAA (EVAR) se ha convertido en un estándar de tratamiento de los AAA⁷⁵. El objetivo del EVAR es la prevención de la rotura del AAA. Varios ensayos clínicos^{76,77,78}, estudios y registros internacionales⁷⁹ han demostrado los beneficios a corto plazo de las endoprótesis aórticas frente a la cirugía abierta. Sin embargo el beneficio inicial del EVAR se ve alterado en parte por su menor durabilidad, con un 30% de reintervenciones necesarias en el largo plazo⁸⁰. Una de las consecuencias del éxito del tratamiento es la retracción del saco aneurismático. Por el contrario, las migraciones de la endoprótesis o la aparición de fugas (relleno del saco aneurismático de sangre, con la consiguiente re-presurización del aneurisma) condicionan un nuevo riesgo de rotura y obligan a realizar un seguimiento estrecho de por vida con repetidas pruebas de imagen.

La diferencia crítica entre ambas modalidades de tratamiento es que en EVAR se mantiene el saco aneurismático inalterado con su trombo mural, permitiendo que continúe el proceso inflamatorio después de la intervención. Al permitir que continúe la degradación de la matriz extracelular, se pueden producir cambios en el saco aneurismático después del EVAR con la consiguiente posibilidad de remodelación e incluso repermeabilización del mismo, a esto se le llama fuga. El

crecimiento del saco aneurismático puede producirse hasta en el 40% de los pacientes⁸¹ y puede cambiar mucho el pronóstico de la enfermedad. En presencia de este crecimiento es importante realizar un tratamiento asociado que puede consistir en clipar o embolizar las ramas que pueda tener en aneurisma (fugas tipo 2) o extender el recubrimiento endoluminal proximalmente o distalmente (fugas tipo 1) o entre dispositivos (fugas tipo 3)⁸². Entre los factores que permiten predecir los casos que tendrán una peor regresión del saco aneurismático están el tamaño del cuello del aneurisma, la presencia de calcificaciones en el cuello del aneurisma o en las arterias ilíacas y la edad del paciente^{83,84}.

Hay pocos estudios que hayan explorado la posibilidad de un tratamiento del saco aneurismático post EVAR. En ellos se pretende evitar el crecimiento del aneurisma con fármacos como la doxiciclina⁸⁵, las estatinas⁸⁶ o los antagonistas del calcio⁸⁷. El comportamiento del saco post EVAR ha despertado el interés de desarrollar otras posibilidades de tratamiento endovascular en fase experimental como el relleno de los aneurismas de aorta con algún material que permita el paso de sangre a su través pero que proteja al tiempo al aneurisma de la presión sanguínea. Se han usado diferentes elastómeros⁸⁸ o materiales inertes⁸⁹ e incluso se han diseñado prótesis específicas para ello⁹⁰. Una de las alternativas terapéuticas que se manejan cuando aparecen algunos tipos de fugas es la embolización del saco aneurismático con diferentes sustancias inertes.

La destrucción progresiva de las células musculares lisas de la túnica media de la pared de los AAA es otra pieza clave en la etiopatogenia de la enfermedad. Existe una mayor tasa de apoptosis celular de la pared de los AAA en contraposición con la pared de la aorta con patología crónica oclusiva. Además, la población celular de SMC que sobrevive, tiene una menor capacidad proliferativa.

Quizá una terapia celular que potencie el desarrollo de esta capa, consiga frenar la evolución hacia el crecimiento y rotura de estos AAA. Con este trabajo

pretendemos abordar un enfoque novedoso mediante el tratamiento directo del saco aneurismático, utilizando un tejido vivo.

2. Bases conceptuales en terapia celular

En las últimas décadas, se ha despertado un gran interés por la investigación en el campo de las células madre debido a su enorme potencial terapéutico.

Se entiende por célula madre aquella célula que posee las características de: autorreplicación, viabilidad a largo plazo y capacidad de diferenciación⁹¹.

Esto es posible gracias a que se dividen de forma simétrica y/o asimétrica, es decir, que cada célula madre origina dos células hijas, una de las cuales conserva su potencial de diferenciación y de autorrenovación, mientras que la otra se dirige hacia una estirpe celular determinada o ambas conservan su potencial de autorrenovación y diferenciación.

Clasificación:

Hay diferentes tipos de células madre, que se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación u origen.

En función de su origen las podemos clasificar en:

- Células madre embrionarias (ESCs).
- Células pluripotentes inducidas (iPS).
- Células madre adultas.

En función de su capacidad de diferenciarse a células procedentes de las distintas láminas se pueden clasificar en: (fig. 3)

- Totipotenciales: tienen capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de células tanto germinal como somáticas.

- Pluripotenciales: se diferencian a cualquier tejido somático.
- Multipotenciales : se diferencian a cualquier tejido derivado de su misma lámina embrionaria.

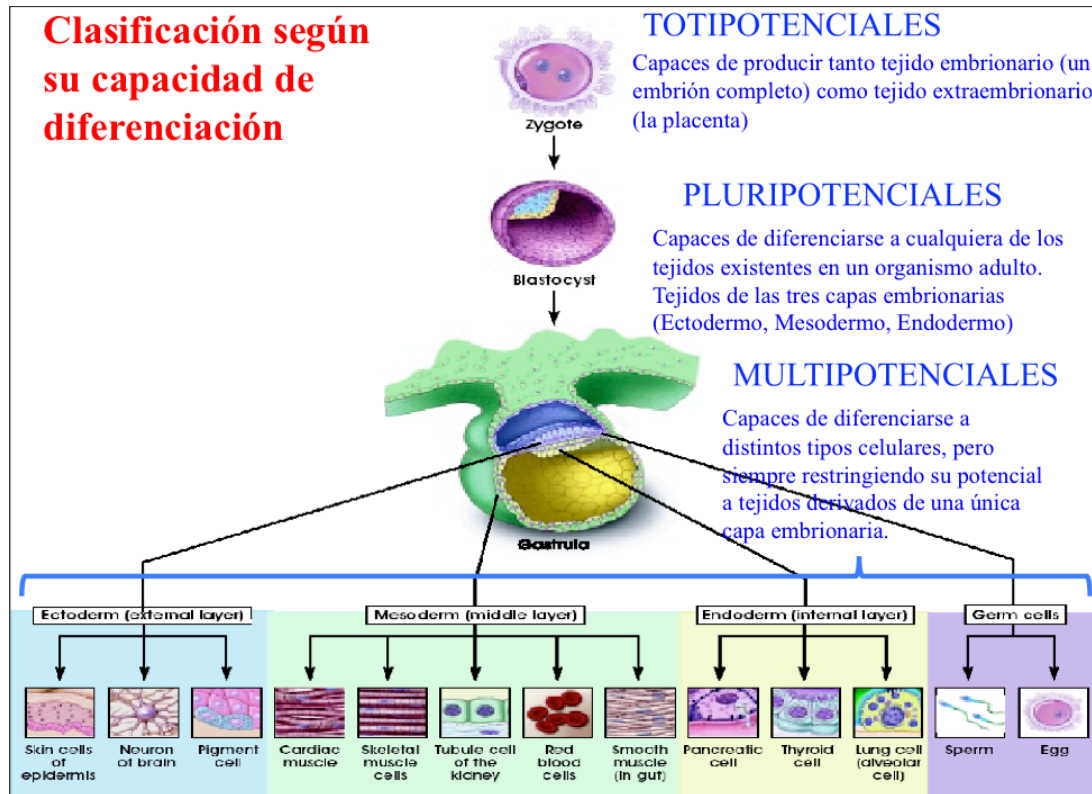


Figura 3. Clasificación de las células madre según capacidad de diferenciación.

Células madre embrionarias (ESCs)

Solamente el cigoto u ovocito fertilizado y las células procedentes de sus dos primeras divisiones se consideran totipotentes, ya que pueden generar cualquier célula germinal o somática. A partir de los 4 días de desarrollo, estas células totipotentes comienzan a especializarse y forman el blastocisto. Las células de la masa celular interna del blastocisto son pluripotentes porque a partir de ellas se desarrollan las tres hojas somáticas (ectodermo, mesodermo y endodermo) que darán lugar a los tejidos y órganos del embrión, pero no a un embrión completo, ya que son incapaces de formar la placenta y las células germinales⁹². Sin embargo, a pesar de la gran capacidad de reproducción y versatilidad de este tipo de células, las ESCs tienen una aplicación clínica limitada debido a los

conflictos éticos derivados del uso de embriones humanos, a la posibilidad de rechazo inmunológico frente a las células trasplantadas⁹³ y su elevado potencial teratogénico; cuando son implantadas in vivo, las ESCs generan masas tumorales benignas, constituidas por varios tejidos embrionarios, denominadas teratomas, que evolucionan con frecuencia hacia tumores malignos o teratocarcinomas⁹⁴.

Células pluripotentes inducidas (iPS)

Las iPS se obtienen a partir de células somáticas, adultas y diferenciadas, que son reprogramadas genéticamente mediante la introducción de una serie de factores de transcripción, implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado en las ESCs, es decir estaríamos hablando de una mezcla de Terapia Celular y Terapia Génica. En 2006, Takahashi y Yamanaka⁹⁵ (Nobel de Medicina 2012 por este descubrimiento) describieron por primera vez la reprogramación de fibroblastos de ratón, a los que se había introducido los factores de transcripción Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc mediante un vector retroviral. Las iPS que obtuvieron presentaban la misma morfología, capacidad de proliferación y diferenciación, patrones de expresión génica, marcadores de superficie y potencial teratogénico que las células madre embrionarias, haciéndolas prácticamente indistinguibles. Un año más tarde, los mismos investigadores⁹⁶, simultáneamente con el grupo de Thomson⁹⁷, demostraron la posibilidad de reprogramar fibroblastos humanos. Aunque son numerosas las investigaciones en curso para conocer con mayor detalle el comportamiento de las iPS, actualmente existen demasiados obstáculos para su aplicación en clínica, ya que aún no se puede controlar este proceso de reprogramación celular ni su capacidad teratogénica.

Sin embargo, estas células constituyen una herramienta muy valiosa para el desarrollo de modelos de enfermedades, evaluación de nuevos fármacos y estudios toxicológicos. En esta línea, ya se está trabajando con iPS obtenidas a partir de fibroblastos de pacientes con atrofia muscular espinal⁹⁸.

Células madre adultas.

El uso de células madre en tejido adulto no genera estos problemas éticos. Y tienen menos potencial que las células ESC pero cada vez se conocen mejor y a gran parte de ellas se las está catalogando como multipotenciales e incluso algunos autores hablan de pluripotenciales. De hecho, hay estudios iniciales con células madre de médula ósea que han dado resultados esperanzadores en el campo de la medicina regenerativa.^{99,100}

El tejido medular del adulto deriva del tejido mesodérmico embrionario y está compuesto por una población de células madre hematopoyéticas (HSC) en el seno del estroma mesenquimal de soporte. Dicho estroma, tanto en animales como en humanos, es muy heterogéneo y contiene gran variedad de poblaciones celulares; una de estas poblaciones la forman las llamadas células madres mesenquimales (MSC) que han demostrado tener capacidad para diferenciarse en estirpes derivadas de la hoja germinal de la que proceden, como adipocitos, fibroblastos, osteocitos, condrocitos y miocitos¹⁰¹, e incluso, bajo determinadas condiciones de cultivo “in vitro”, pueden dar lugar a células de linajes no mesodérmicos, como neuronas, células endocrinas pancreáticas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos^{102,103}.

Afortunadamente, la médula ósea no es el único órgano que contiene este tipo de células estromales; se ha descrito que la mayoría de los tejidos adultos presentan una pequeña proporción de células madre, generalmente de naturaleza multipotente. Se trata de reservorios de células “reparadoras”, que participan en la homeostasis tisular reemplazando a las células senescentes que se renuevan por mecanismos fisiológicos¹⁰⁴ y también podrían ser movilizadas e inducidas a diferenciarse en respuesta a señales liberadas en caso de lesión o estados patológicos.¹⁰⁵ Este tipo de células se ha logrado identificar en una gran variedad de tejidos y órganos, como hueso trabecular, periostio, membrana sinovial, músculo, tejido adiposo, glándula mamaria, tracto digestivo, sistema

nervioso central, pulmón, sangre periférica, dermis, folículo piloso, limbo corneal, etc.⁸⁷

En la mayoría de los casos, las células madre de los tejidos adultos son capaces de diferenciarse en linajes celulares propios del nicho en el que se localizan, por ejemplo, las células madre del sistema nervioso central generan neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Incluso pueden existir células madre unipotentes, como las que se encuentran en la capa basal de la epidermis interfolicular (productoras de queratinocitos) o las células satélite que se encuentran en la lámina basal del tejido muscular y que son básicas en el proceso de reparación⁸⁷.

Analizando las diferentes posibilidades que nos presenta el estroma del organismo, para este trabajo se decidió utilizar aquellas que, desde nuestro punto de vista, nos presentaban una mayor facilidad de obtención, generando poca morbilidad y dolor para el animal de experimentación, adaptando así un protocolo fácil de aplicar en el ser humano. Estas células elegidas son las células madre o troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo.

Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASCs)

Gimble¹⁰⁶ definió los criterios que debería cumplir la fuente ideal de ASCs para uso médico:

1. Muy abundantes (millones o billones de células)
2. Poca morbilidad para la obtención
3. Capacidad para diferenciarse a múltiples líneas celulares de manera reproducible y regulada.
4. Capacidad de ser transplantada de forma autóloga y alogénica de forma segura para el organismo receptor.
5. Facilidad para manufacturación.

Teniendo en cuenta dichos criterios, el tejido graso es un candidato idóneo. Debido a la tendencia a la obesidad en la sociedad moderna, la grasa es un tejido realmente abundante, cuya técnica de obtención es reproducible, con una morbilidad de la zona donante insignificante y una tasa de complicaciones realmente baja (inferior al 0,1%). Además, pequeñas cantidades de tejido graso poseen gran cantidad de MSCs. Un gramo de grasa contiene aproximadamente 5×10^5 MSCs, lo que supone una concentración 500 veces superior a la de la médula ósea. Además, la ausencia de marcadores de histocompatibilidad de clase II en su membrana permiten utilizarlas de forma alogénica, cumpliendo de esta manera todos los criterios definidos anteriormente.

Las células madre derivadas de tejido adiposo, denominadas actualmente ASCs por sus siglas en inglés de "*Adipose-derived Stem Cells*", fueron identificadas por primera vez por Patricia Zuk y sus colaboradores en 2001⁹⁷. El tejido graso es un tejido de origen mesodérmico y contiene gran cantidad de tejido de soporte o estroma, que al igual que el estroma de médula ósea, tiene una población muy heterogénea que incluye MSCs (fig. 4). Según las asociaciones científicas, una célula se puede catalogar de célula madre mesenquimal cuando cumple con los criterios anteriormente expuestos de células madre y además: tiene adherencia a los plásticos con morfología fibroblástica, tiene unos marcadores de membrana específicos (CD 29, CD 44, CD 90, CD 105, etc.) y una ausencia de otros marcadores (CD 34, CD 45, CD133, etc.), y es capaz de diferenciarse, al menos, a adipocito, osteocito y condrocito. En la actualidad, está demostrado que existe una población en la fracción vasculo-estromal del tejido adiposo que cumple con todos estos criterios.

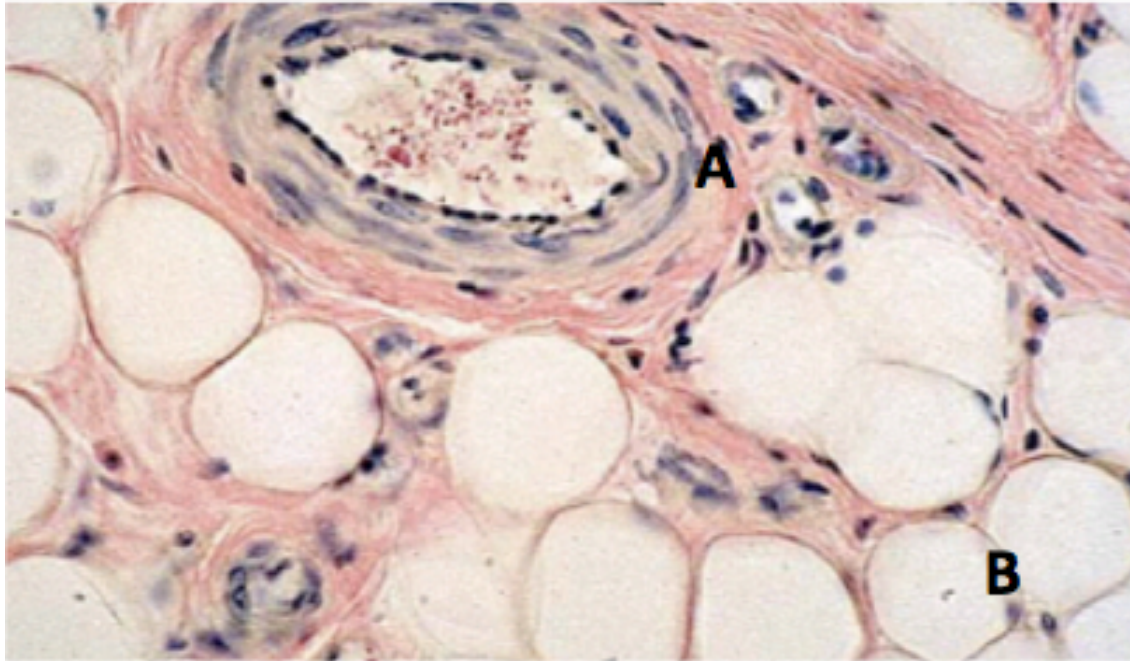


Figura 4. Estructura del tejido graso. (A) Fracción estromal. (B) Adipocitos. Hematoxilina-eosina x100.

Estas células, al igual que las MSCs de médula ósea, presentan el potencial “in vitro” de diferenciación a diferentes tejidos mesodérmicos (como tejido graso, óseo, condral, muscular⁹⁶) y la capacidad de autorrenovación. También han demostrado que son capaces de secretar numerosas citoquinas y factores de crecimiento con propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas e inmunomoduladoras. Entre ellas el factor de crecimiento para el endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento para hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento-1 semejante a insulina (IGF-1), implicados en procesos de angiogénesis, cicatrización y reparación tisular¹⁰⁷.

Aún falta mucho por conocer sobre las ASCs, pero sí se ha demostrado un elevado efecto antiinflamatorio y angiogénico, una amplia capacidad de liberación de factores de crecimiento (especialmente vascular y fibroblástico) y un papel regulatorio sobre la secreción de metaloproteasas, lo que las hace unas candidatas ideales para el objeto de este estudio.

La ya comentada capacidad de secreción de citoquinas proangiogénicas convierte a las ASCs en buenas candidatas para la terapia celular de las patologías isquémicas. Por ejemplo, se ha observado que la administración intravenosa o intramuscular de ASCs en un modelo murino de isquemia de las extremidades inferiores mejora notablemente el riego sanguíneo^{108,109}. Este resultado puede deberse al efecto directo de la diferenciación de las ASCs en células endoteliales, o a un efecto indirecto por la secreción de factores de crecimiento que estimulan la neovascularización y actúan de forma paracrina, reclutando las células madre endógenas hacia la zona lesionada.

Las ASCs regulan la función de las células T, al promover la inducción de células T supresoras e inhibir la producción de células T citotóxicas y células NK. Estos efectos, complementados por la secreción de factores solubles como *interleuquina-10* (IL-10), *factor de crecimiento transformante beta* (TGF- β) y *prostaglandina E2*, justifican la capacidad inmunosupresora de estas células, como se ha puesto de manifiesto en un ensayo clínico para el tratamiento de la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD) mediante inyección intravenosa de ASCs^{110,111}. Esta función inmunosupresora de las ASCs y su efecto adyuvante en la cicatrización se refleja también en los esperanzadores resultados que se están obteniendo en diversos ensayos clínicos, como el trasplante de ASCs para el tratamiento de fístulas en pacientes con enfermedad de Crohn¹¹² y de úlceras crónicas causadas por la radioterapia¹¹³ y otros muchos, llegando actualmente a encontrarse 61 ensayos clínicos para diferentes patologías con estas células en el registro americano (<http://clinicaltrials.gov>).

En lo referente al potencial miogénico de las ASCs, Zuk⁹⁷ demostró la capacidad de diferenciación a miocitos “in vitro”. Éste potencial miogénico viene determinado, según Rocco¹¹⁴ por la expresión de las proteínas de membrana CD34 y/o Sca-1. Sin embargo, las células que se utilizan en este experimento son CD34 negativas. Dato a tener en cuenta en el análisis de los resultados definitivos.

Este mismo autor¹⁰⁹ ha confirmado esta capacidad miogénica ya definida por Zuk, pero ha encontrado que se encuentra claramente potenciada cuando se cultivan junto a mioblastos primarios. Este mismo estudio también realizó un experimento “in vivo” en un modelo de lesión muscular isquémica, encontrando células ASCs en el 20% de los miotúbulos en reparación, confirmando que las ASCs son capaces de participar en el proceso de reparación muscular si se encuentran en un “entorno miogénico” como puede ser el existente después de una rotura muscular. Esta circunstancia ha sido confirmada in vivo por Bacou¹¹⁵, que ha encontrado una mejoría funcional y de tamaño en tejido muscular esquelético tratado con ASCs.

2.1 Células madre en patología vascular

Recientemente se han aislado células progenitoras endoteliales (EPC) circulantes en sangre periférica¹¹⁶. Estas células se activan en respuesta a la isquemia y participan en la formación de neovasos transformándose en células endoteliales. Cuando se produce una lesión tisular secundaria a la isquemia los tejidos lesionados liberan un conjunto de citocinas (VCAM, VEGF...) ^{117,118}, factores de crecimiento, etc. que estimulan la liberación al torrente sanguíneo de estas EPC. Otros estímulos que parecen activar la liberación de estas células son el ejercicio físico y las estatinas¹¹⁹.

El origen de estas EPC parece doble. Por un lado la médula ósea y por otro el propio sistema circulatorio (EPC *residentes*)¹²⁰.

Las EPC actúan in situ de manera directa en la vasculogénesis, pero también de forma indirecta, esto es, situándose en el intersticio del tejido lesionado y secretando todo tipo de citocinas y factores de crecimiento pro-angiogénicos y estimulantes de las propias EPC que favorecen la migración y proliferación de éstas (VEGF, factor de crecimiento hepatocítico, angiopoyetina-1, Óxido Nítrico sintetasa, etc.).

Se sabe que en los pacientes con enfermedad arterial periférica existe un número reducido de células progenitoras endoteliales circulantes que además funcionan peor, particularmente en los diabéticos.^{121,122}

En este campo todas las publicaciones y líneas de investigación se han centrado hasta ahora en la capacidad de estimulación directa de la angiogénesis de las células progenitoras endoteliales. Así, los estudios clínicos que se han realizado y que se proyectan tratan de aportar luz al hecho ya conocido de que las células madre estimulan la neoangiogénesis y que por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de la isquemia de miembros inferiores. También siguen esta línea los estudios realizados en el campo de la cardiología (isquemia miocárdica).

Existen unos 30 estudios sobre el uso de células progenitoras derivadas de la médula ósea en pacientes con enfermedad arterial oclusiva de miembros inferiores o isquemia crítica. Casi todos los resultados son positivos desde un punto de vista clínico, aunque se ha tratado siempre de series pequeñas y sin controles ciegos¹²³. Lo que todavía no está claro es la población ideal de células a utilizar, el número de células a implantar, la vía óptima de implantación (intraarterial, intramuscular o ambas), el número de sesiones de tratamiento necesarias y los pacientes que más se pueden beneficiar de esta terapia y en qué casos¹²⁴.

Lo cierto es que la capacidad para estimular la formación de neovasos parece relacionarse más bien con un complejo entramado de señales que secretan estas células, más que por su diferenciación directa en neovasos ante determinados estímulos como la isquemia (estímulo indirecto).

Pensamos que esta respuesta moduladora puede ser igualmente interesante y aplicable a la curación del otro grupo de pacientes con arterioesclerosis severa: los que desarrollan aneurismas. De la misma manera que ante la isquemia se produce una respuesta neoformadora de vasos, ante el estímulo de una pared arterial enferma, que se debilita y deforma en el tiempo con el consiguiente

riesgo de rotura, las células madre pueden estabilizar el proceso actuando de moduladoras de la respuesta inflamatoria que rodea al cuadro. Si además del tratamiento endovascular, que elimina el estímulo hemodinámico, se usaran ASCs se podría optimizar el resultado final, mejorando los resultados del tratamiento endovascular. Hasta donde sabemos este es el primer estudio que se realiza con esta hipótesis de trabajo: Las ASCs serían capaces de modular la reparación de la pared arterial enferma de los aneurisma de aorta.

3. Modelos experimentales.

Se han desarrollado muchos modelos de AAA experimentales para el desarrollo de las prótesis endovasculares usadas en su tratamiento. Se han descrito modelos en ratones¹²⁵, ratas¹²⁶, conejos¹²⁷, perros¹²⁸ y cerdos¹²⁹. Los más utilizados son los aneurismas fabricados a expensas de parches de vena y los que se basan en la inyección intraluminal de elastasa, una enzima que degrada las fibras elásticas de la pared del vaso. Los modelos que usan la elastasa consiguen aneurismas fusiformes pero de pequeño tamaño, con un elevado coste, necesitan más tiempo de preparación y más de un acto quirúrgico; lo que conlleva una alta mortalidad por rotura de los mismos, razones todas ellas por lo que desechamos dicho modelo para nuestro trabajo¹³⁰.

Los modelos en animales pequeños no son útiles para el estudio de técnicas endovasculares, por la discordancia de tamaño con y los dispositivos existentes. Por otro lado, el modelo experimental ideal debería ser simple, reproducible y evitaría la exposición quirúrgica abdominal.

Para el estudio de dispositivos endovasculares se necesitan modelos en animales grandes, muchas veces difíciles de obtener y mantener por razones económicas y de espacio. El modelo que hemos desarrollado en nuestra unidad no evita la cirugía abdominal, pero sí simplifica en un sólo acto quirúrgico la realización del modelo y su tratamiento sin ocasionar daños irreparables a la vasculatura, por ejemplo de los miembros inferiores (al no usarlos como acceso

arterial) o daños que supongan un deterioro importante de la calidad de vida del animal durante el periodo de seguimiento.

Por estas razones en este estudio no se ha usado un parche de vena como en otros modelos, sino un parche protésico de Dacron. De esta forma, se simplifica el largo acto quirúrgico y nos permite realizar en durante el mismo el tratamiento endovascular. Como es evidente, este aneurisma artificial dista mucho del aneurisma arterial que pretendemos imitar, pero tiene, desde nuestro punto de vista, otras ventajas. El introducir un material externo y hacerlo mediante la agresión que supone la cirugía añade al modelo el elemento de inflamación. Esta inflamación, aguda por definición, no es como la inflamación crónica que rodea a la aparición de los aneurismas verdaderos, pero sí tiene mecanismos comunes que podemos estudiar desde un punto de vista histológico. Además este modelo permite fijar con precisión el tamaño del aneurisma que se crea y valorar cambios en el saco aneurismático tratado. Al ser un material inerte implantado en la aorta de un animal que va a crecer rápidamente, se pueden imitar de alguna manera los cambios de forma del saco aneurismático tratado, pero en un corto espacio de tiempo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis Principal:

Las células troncales mesenquimales procedentes del tejido adiposo son capaces de sobrevivir en el saco de un aneurisma de aorta tratado mediante endoprótesis y son capaces de estabilizar dicho saco mediante la formación de un tejido cicatricial y de disminuir la inflamación de la pared arterial.

Hipótesis Nula:

Las células troncales mesenquimales procedentes del tejido adiposo no tienen efecto alguno sobre el saco aneurismático tratado de forma endovascular.

Objetivos:

1. PRIMERA FASE:

- Puesta a punto y comprobación de un modelo animal de aneurisma de aorta abdominal tratado mediante endoprótesis.
- Comprobar la permanencia y viabilidad de un implante de células madre mesenquimales asociado a un pegamento de fibrina en el interior de un aneurisma arterial al tratarlo de forma endovascular a corto plazo.

2. SEGUNDA FASE:

- Valorar la supervivencia de las células troncales mesenquimales a largo plazo
- Estudiar el posible efecto estabilizador y cicatrizante en el seno del saco aneurismático y las capas de la arteria dañada.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz. Se siguió el protocolo aprobado por el CEBA (Comité Ético de Bienestar Animal) del Hospital Universitario La Paz y teniendo en cuenta las normas de la Directiva Comunitaria sobre animales de experimentación (86/609/CEE) así como la normativa española (RD 1201/2005). La estabulación fue individual y se realizó un control diario de los animales por el equipo investigador y el personal del animalario. La estabulación de los animales se realizó en el animalario del propio Servicio para los periodos cortos de seguimiento y en el Hospital Veterinario Sierra de Madrid de San Agustín de Guadalix para los periodos de más de un mes, también previa concesión de los permisos pertinentes por la Comunidad de Madrid.

Obtuvimos financiación privada (Boston Scientific) para la primera fase y después de analizar sus resultados conseguimos una beca del Instituto de Salud Carlos III (PS11/00116) para realizar la segunda fase.

1. PRIMERA FASE

1.1 Diseño experimental

Se intervienen 6 cerdos de la raza Large-White de unos 25 kg de peso. A cada animal se le realizan dos aneurismas de aorta abdominal. En cada animal ambos aneurismas reciben el tratamiento endovascular, pero sólo uno de ellos es tratado además con células troncales mesenquimales con la cantidad óptima de células por volumen, 10^7 /ml (caso y control en el mismo animal), como se describe más adelante. Las células están previamente marcadas con GFP (Proteína Verde Fluorescente) para poder detectar su presencia ulteriormente. El periodo de seguimiento es de 1 día, 1,3,5,7 y 9 semanas.

Estudiamos las muestras obtenidas mediante inmunofluorescencia para detectar la presencia de las células troncales y mediante estudio histológico con tinción de hematoxilina eosina.

1.2 Aislamiento, cultivo, crecimiento, caracterización, transfección y diferenciación celular.

En la primera fase del estudio se obtuvo la grasa abdominal de un caso de prueba. En la segunda fase, de otro caso: el único animal macho de toda la serie. De esta forma, al tener todas las células troncales un cromosoma Y, este podría ser detectado ulteriormente.

Todas las manipulaciones de la muestra en abierto se realizan en condiciones asépticas en el interior de la cabina de seguridad biológica en la Unidad de Terapia Celular (UTC) del Hospital La Paz. En cada etapa, los datos pertinentes se registran adecuadamente en el correspondiente Registro de obtención de fracción estromal de tejido adiposo (REG-PNT-001-02) adaptado a la obtención a partir de tejido adiposo. Todos los materiales, medios y reactivos sobrantes se eliminan como residuos biosanitarios.

Protocolo:

- 1) Antes de comenzar, descongelar las alícuotas necesarias de solución 6X de colagenasa I almacenada en la UTC (15% del volumen total de tejido adiposo antes de procesar) y activarlas mediante incubación a 37°C durante un mínimo de 1 hora y un máximo de 2 h.
- 2) Introducir en una cabina de flujo laminar las botellas estériles conteniendo la muestra de grasa.
- 3) Disgregar la grasa mediante tijeras y/o bisturí y depositar los fragmentos sobre un tubo con PBS (Tampón salino fosfato)
- 4) Centrifugar los tubos que contienen la muestra de tejido adiposo a 300G durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todas las centrifugaciones posteriores se realizarán en las mismas condiciones.
- 5) Eliminar la fracción soluble (inferior) aspirando con pipeta y depositar dicha fracción en un recipiente para su posterior eliminación como residuo biosanitario.
- 6) Añadir PBS hasta un volumen total de 50 ml/tubo y volver a centrifugar.

- 7) Añadir a cada tubo 1/5 volumen de la solución 6X de Colagenasa I (concentración final 0,075%) previamente activada, y homogeneizar mezclando suavemente por inversión.
- 8) Incubar a 37°C con agitación suave durante 30 minutos.
- 9) Inactivar añadiendo el mismo volumen de medio de cultivo (DMEM) + 10% FBS (Suero Fetal Bovino) que colagenasa y mezclando suavemente por inversión.
- 10) Centrifugar y retirar con pipeta la fracción superior dejando únicamente el agregado celular.
- 11) Lavar el agregado celular con PBS (50 ml/tubo), centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- 12) Resuspender el agregado celular de cada tubo en 10 ml de la solución de lisis de eritrocitos. (0,16M de Cloruro amónico)
- 13) Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
- 14) Añadir PBS a cada tubo hasta un volumen final de 50 ml.
- 15) Centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- 16) Resuspender el agregado celular de cada tubo en 5 ml de PBS y reunir las células procedentes de los tubos procesados en un único tubo.
- 17) Filtrar las células por filtro de nylon de 70 µm, sobre nuevos tubos de 50 ml, y realizar un lavado del filtro utilizado con igual volumen de PBS (25 ml/tubo). Utilizar tantos filtros como sea necesario, a medida que los filtros usados se obstruyan.
- 18) Centrifugar, eliminar el sobrenadante y resuspender el agregado celular de cada tubo en 5 ml de PBS.
- 19) Juntar toda la suspensión celular obtenida en un único tubo de 50 ml y centrifugarlo.
- 20) Eliminar el sobrenadante, resuspender el agregado celular en 20 ml de PBS y volver a centrifugar.
- 21) Eliminar el sobrenadante y resuspender el agregado celular en 10 ml de Medio de cultivo completo (DMEM +1 0%FBS + 1% Penicilina/estreptomicina).

- 22) Separar 100 μ l para contar las células tiñéndolas con azul tripán según UTC-PNT-003.
- 23) El resto de las células se siembran sobre tubos estériles de 75 cm^2 y se incuban a 37°C y 5% de CO_2 , en una densidad de 30.000 células por cm^2 .
- 24) A las 48 horas se lava la placa de cultivo con PBS y se añade nuevo medio de cultivo completo manteniendo la incubación de las células adherentes, a las cuales se les cambia el medio de cultivo cada 3-4 días para “refrescar” los nutrientes necesarios.
- 25) Cuando se alcanza el 80% de confluencia, las células se despegan de la placa de cultivo con tripsina/EDTA. Tras neutralizar la tripsina con medio de cultivo, se centrifuga (300G 10 minutos temperatura ambiente).
- 26) Por último se realiza una expansión celular; se realiza un recuento de las células obtenidas y se subcultivan a razón de 30.000-50.000 células/ cm^2 para expandir hasta el número necesario. Cuando se ha obtenido el número de células necesarias para todos los ensayos se criopreservan en una solución de 10% de dimetilsulfóxido en suero fetal bovino y se almacenan en nitrógeno líquido hasta su futura utilización (se ha demostrado que pueden criopreservarse de forma indefinida manteniendo su viabilidad y propiedades biológicas)¹³¹.
- 27) Parte de las células se reservaron para caracterizarlas y para diferenciarlas, demostrando así que son MSC según los criterios internacionales.
- 28) Antes de utilizar las células, se descongelaron y cultivaron según lo expuesto anteriormente durante 10 días, de tal manera que todas las células se hubieran duplicado y se comprobara que la congelación no había afectado sus características.

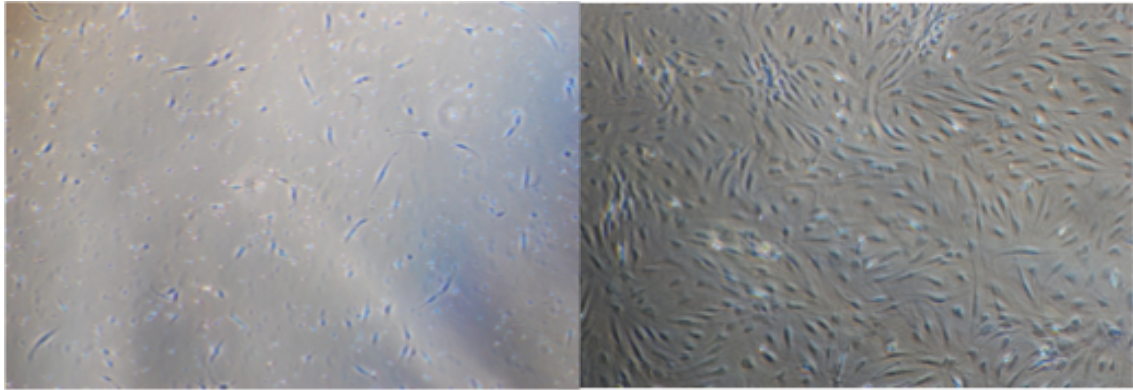


Figura 5. Células recién aisladas (4 horas en cultivo) y en subconfluencia (10 días en cultivo).

Caracterización de ASCs

Actualmente la comunidad científica internacional ha aceptado que las ASCs deben tener las siguientes características:¹⁰⁰

- Las células se adhieren a las placas de cultivo.
- Son positivas para los siguientes marcadores de membrana (CD9, CD29, CD44, CD49a, CD51, CD73, CD90, CD105).
- Son negativas para los siguientes marcadores de membrana (CD3, CD11b, CD14, CD34, CD45, CD54, CD133, CD79α, CD19 y HLA-DR).

El análisis de la expresión de antígenos de membrana de las ASCs se llevó a cabo en un citómetro láser de argón FACScan (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, EEUU). Para ello, aproximadamente 1×10^5 células en suspensión en PBS se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con los siguientes anticuerpos monoclonales de AbD Serotec conjugados con fluorocromos CD45- (FITC), CD90+ (APC), CD34- (PE), CD 105+ (FITC), CD 29+ (PE) y HLA DR- (PE). Se adquirieron, al menos, 1×10^4 eventos por tubo utilizando como soporte informático el programa CELLQuest Pro (BDB). La población celular se consideró positiva para un marcador determinado cuando su media de la intensidad de fluorescencia (IMF) expresada en unidades lineales y arbitrarias en una escala de 0 a 1023, era mayor que la IMF más dos veces la

desviación estándar de la autofluorescencia obtenida para la misma población celular.

Se caracterizaron las células antes de ser congeladas y tras su descongelación; de esta manera comprobamos que la congelación no había alterado sus características.

Transfección de las ASCs

Para poder realizar fácilmente el seguimiento de las células durante la primera fase una vez inoculadas, las sometimos a un proceso de transfección con un gen que se puede reconocer fácilmente mediante microscopía de fluorescencia: un lentivirus que expresa citoplásmicamente el gen GFP (Proteína verde fluorescente) siguiendo las indicaciones del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares), centro donde se adquirió el lentivirus transfectado.

Diferenciación de las ASC

Diferenciación adipogénica:

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo y se mantuvieron en cultivo renovando el medio cada 3-4 días hasta llegar a confluencia. Tras varios días confluentes se indujo su diferenciación a adipocitos. El medio de cultivo adipogénico (medio de inducción) se componía de: DMEM-10 suplementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), dexametasona $1 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), insulina $10 \mu\text{M}$ (Actrapid®, NovoNordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) e indometacina $200 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) durante 14 días, renovándolo cada 2 días. Posteriormente las células se cultivaron durante 4 días más con DMEM-10 suplementado sólo con insulina $10 \mu\text{M}$ (medio

de mantenimiento). Los controles negativos fueron ASCs cultivadas sólo con DMEM-10 durante el mismo periodo de tiempo. Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 0,3% en isopropanol 60% durante 30 minutos en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con PBS. A continuación se extrajo el ORO de las células añadiendo isopropanol y se midió la absorbancia a 510 nm en el lector de placas.

Diferenciación osteogénica:

Bajo las mismas condiciones de siembra que en el apartado anterior, las células confluentes fueron inducidas a diferenciarse a osteocitos mediante la incubación con medio osteogénico durante 28 días, renovando el 60% del volumen cada 3-4 días. La composición del medio fue la siguiente: DMEM-10 suplementado con dexametasona 0,01 μ M, ascorbato-2-fosfato 50 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), y β -glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). El control negativo de diferenciación consistió en cultivar las células con DMEM-10 durante 28 días. Tras el periodo de incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los depósitos ricos en calcio secretados por los osteocitos a la matriz extracelular se visualizaron mediante la tinción de Alizarin Red S (ARS) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU). Las células fijadas se incubaron con ARS al 1% en agua destilada a pH 4,1 durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, con agitación suave. A continuación, el exceso de colorante se eliminó tras varios lavados con agua destilada. La cuantificación del colorante depositado se llevó a cabo mediante su extracción con cloruro de cetilpiridinio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 10% (p/v) en fosfato sódico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) 10 mM a pH 7 y midiendo la absorbancia de los extractos diluidos 1/10 en el lector de placas a 540 nm.

1.3 Intervención Quirúrgica.

Protocolo anestésico: (fig. 6)

- 1) Analgesia preoperatoria: parche de fentanilo 24 horas antes de la intervención.
- 2) Premedicación: Ketamina 10mg/Kg(i.m), Midazolam 0,4mg/Kg (i.m), Tramadol 5mg/Kg (i.v).
- 3) Inducción: Isoflurano 5%, Mantenimiento Isoflurano 5% e infusión continua de morfina, ketamina y lidocaina.
- 4) Analgesia postoperatoria: Tramadol 5mg/Kg(i.m) durante 48 horas. Parche de Fentanilo cada dos días durante una semana, iniciando la tolerancia al día siguiente de la intervención y vigilando el bienestar del animal.
- 5) Antibioticoterapia: Cefotaxima 40mg/Kg(i.m) desde 3 días antes y hasta 72 horas después.

Protocolo quirúrgico: Mediante laparotomía media para la realización en ellos de un aneurisma aórtico abdominal según:

- 1) Disección y control de la aorta infrarrenal hasta la bifurcación iliaca doble.
- 2) Heparinización sistémica con 3000 UI de Heparina iv.
- 3) Clampaje infrarrenal y sutura de dos parches de dacron de forma ovalada de 2cm de largo por 1cm de ancho (fig. 7). Evitamos clipar todas las arterias lumbares posibles, para no eliminar del todo la posibilidad de fuga tipo 2.
- 4) Estos dos parches quedan separados por aproximadamente 1cm de aorta sana proximal (hasta la salida de las arterias renales), 1cm de separación entre ambos y 1cm hasta la primera bifurcación aórtica. De esta forma obtenemos dos aneurismas fusiformes de pequeño tamaño contiguos en unos 5cm de aorta abdominal (aproximadamente).
- 5) Desclampaje y hemostasia cuidadosa de ambos parches.
- 6) Control de aorta distal y clampaje de la misma y de las ramas iliacas. Sobre la aorta distal bifurcada se sutura un tubo recto de dacron de 8mm de diámetro que servirá de acceso para los dispositivos endovasculares.

7) Hemostasia de la anastomosis y pre-clotting de la prótesis (al tratarse de material reesterilizado sobrante de la actividad quirúrgica habitual del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital La Paz, las prótesis de Dacron pierden su recubrimiento de gelatina y se hacen más porosas, siendo necesario provocar un recubrimiento plaquetario mínimo para mejorar la hemostasia)¹³².



Figura 6. Intubación en decúbito prono. Con los animales de mayor seguimiento esta maniobra podía ser difícil debido al tamaño que alcanza el animal (en la imagen, caso de 3 meses de seguimiento, 84kg de peso).

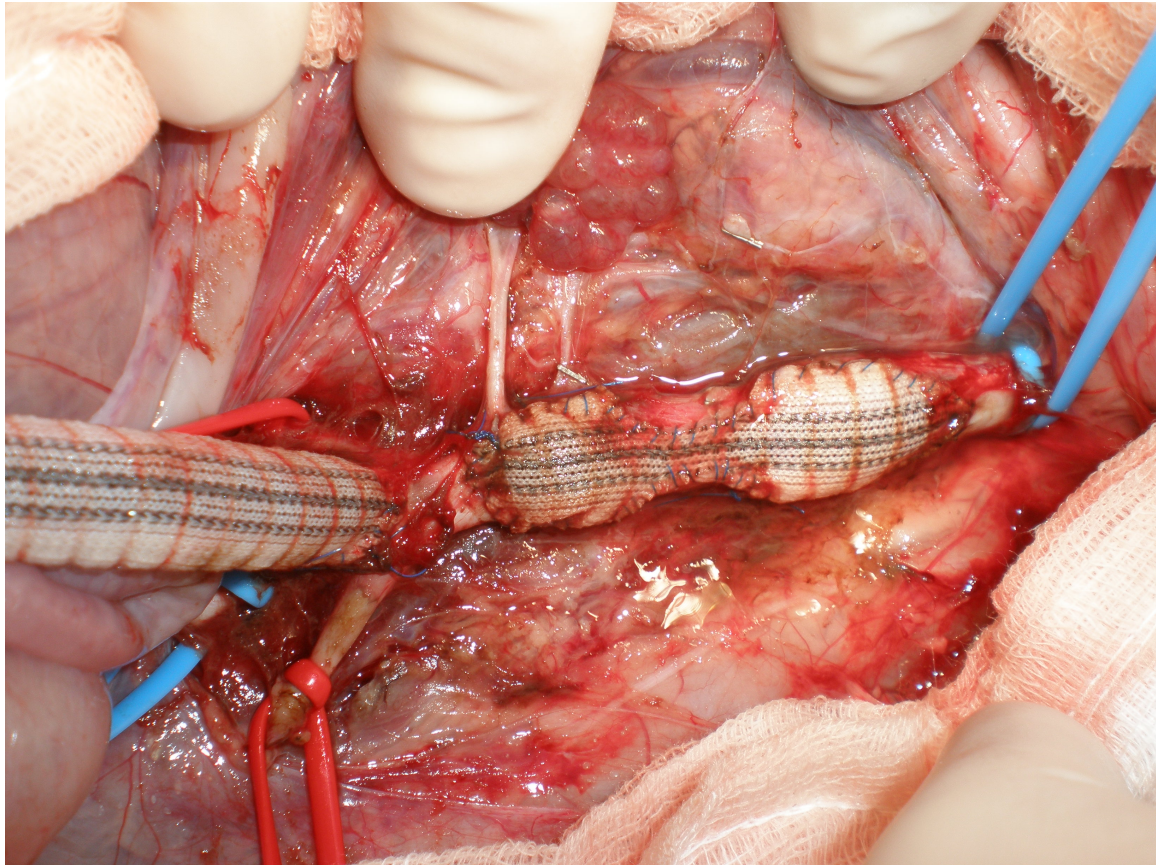


Figura 7. Imagen quirúrgica del aneurisma doble una vez suturado a la aorta. Sobre la bifurcación iliaca se anastomosa un tubo recto de dacron para el acceso de la endoprótesis sin dañar las arterias nativas.

Una vez preparado el modelo se procede, mediante control radioscópico, al tratamiento endovascular de los aneurismas creados mediante una única endoprótesis modelo Wallgraft (Boston Scientific, Boston MA, EEUU) del tamaño apropiado para cubrir con ella ambos aneurismas sin tapar ni las arterias renales ni la bifurcación iliaca (6-8mm de diámetro x 5-7cm de longitud) y con una adecuada sobredimensión del stent para prevenir los cambios de tamaño de la aorta. El Wallgraft es un stent recubierto autoexpandible de acero recubierto de un material de mediana porosidad que permite una adecuada aposición con el tejido del vaso tratado y una adecuada impermeabilización del mismo. Para ello utilizamos un introductor de 9-10F en la prótesis de dacron previamente suturada a la aorta terminal y cateterización con guía hidrofílica (Terumo, Tokio Japón) de todo el eje aórtico.

Antes de completar la exclusión de los aneurismas se deja un catéter multipropósito de 4F (Cordis, J&J Bridgewater NJ, EEUU) dentro del saco aneurismático proximal a través de un segundo introductor de 5F, también colocado en la prótesis de dacron, y una vez completada esta exclusión se utiliza como vehículo para colocar las células troncales resuspendidas en pegamento de fibrina (Tissucol Duo, Baxter) dentro de este saco.

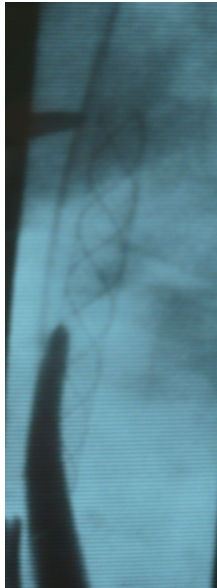


Figura 8. Imagen de escopia durante el procedimiento. Los extremos del aneurisma se marcan con mosquitos para ajustar perfectamente la endoprótesis y evitar complicaciones durante su liberación

Se preparan 10 millones de células troncales porcinas que se disuelven en 1cc del componente de trombina del Tissucol (Baxter, Deerfield IL, EEUU). Se comprueba la correcta colocación del catéter mediante fluoroscopia y se introduce el volumen (1 cc) de Tissucol en él. Para asegurarse de que nada se queda en la luz del catéter se introduce 0,5cc de suero limpio inmediatamente después, para saber con exactitud la cantidad de células que implantamos. En los aneurismas controles sólo se introduce el Tissucol. La misma cantidad pero sin células madre.

Finalmente se cierra el retroperitoneo con sutura trenzada reabsorbible y el abdomen con material trenzado no reabsorbible.

A medida que avanzaba el estudio se iban planteando cuestiones imprevistas a las que había que dar una solución y que se resumen a continuación:

1.- Es conveniente dejar a dieta absoluta al animal por lo menos el día antes (sin restricción hídrica) y asociarle soluciones evacuantes para tener el intestino lo más vacío posible durante la intervención. Esto facilita enormemente la movilización de las asas, la disección retroperitoneal y por supuesto la recuperación del animal. Los cerdos apenas sufren ileo paralítico, pero aún así la experiencia en humanos pone de manifiesto que el ayuno preoperatorio minimiza el discomfort postquirúrgico.

2.- Es importante iniciar la analgesia tópica dos días antes de la intervención para tener niveles adecuados en el postoperatorio inmediato.

3.- Nada más abrir la cavidad peritoneal hay que realizar una talla vesical para que la abundante diuresis del animal no entorpezca la cirugía (el sondaje preoperatorio es muy complicado en animales de este tamaño). Es importante mantener una fluidoterapia abundante para compensar las pérdidas insensibles que la apertura del peritoneo ocasiona y forzar la diuresis del animal que se puede ver afectada por el clampaje aórtico infrarrenal. Al no disponer de analíticas seriadas durante la intervención, también se extrapola la experiencia en cirugía en humanos.

4.- En la primera serie, en lugar de suturar dos parches separados suturamos uno sólo con la forma de dos rombos, para acortar los tiempos operatorios y sobre todo el tiempo de clampaje aórtico, que en ningún caso superó los 35 minutos.

5.- La prótesis de Dacron que utilizamos como acceso para la endoprótesis y las células, al ser reutilizada (reesterilizada, procedente del quirófano de Cirugía Vascular del Hospital La Paz) pierde parte de su impermeabilidad, por lo que es necesario hacer un *pre-clotting* de la misma. Esta técnica, que se usaba antes en la clínica, cuando los materiales no venían recubiertos de una gelatina impermeable como ahora, consiste en rellenarla momentáneamente de sangre del paciente y cerrar la entrada al flujo, de manera que la sangre atrapada en su interior crea, a través de la función de sus plaquetas, una fina capa plaquetaria que impermeabiliza la prótesis. Es mejor y más rápido usar esta vía de entrada al árbol arterial que usar ambas femorales, que son muy finas y habrían de ser reparadas al final para evitar la isquemia residual de ambos MMII, con el consiguiente sufrimiento del animal.

6.- El arco portátil de Radioscopia del Servicio de Cirugía Experimental es muy antiguo y ofrece una mala calidad de imagen. Además la mesa operatoria también es inadecuada, porque no es completamente radiotransparente, de forma que hay que colocar muy bien al animal para centrar la zona a tratar en la zona de mejor visibilidad. Aún así es conveniente marcar con pinzas de mosquito los aneurismas y las zonas que no deseamos ocluir con la endoprótesis, para ser absolutamente precisos en su implante. Esta situación no se da en la clínica, donde se usan otro tipo de marcas anatómicas no invasivas que también facilitan la precisión en el desarrollo de la técnica (fig. 8).

7.- Hay que seleccionar muy bien la endoprótesis. Adecuar el calibre y sobretodo la longitud de la endoprótesis a la aorta que vamos a tratar para evitar oclusiones indeseadas o aneurismas sin tratar. De nuevo la experiencia acumulada en la clínica diaria facilita enormemente este punto.

8.- El pegamento de fibrina puede colapsar el catéter a través del cual vamos a implantar las células. Por ello es necesario inyectar un volumen reducido y de forma rápida, llenando el catéter de suero inmediatamente después, para evitar que se colapse y que se quede las células retenidas en su interior. Hemos

utilizado el menor volumen posible de este material de forma que la concentración celular inyectada era la mayor posible. En la luz del catéter multipropósito de 5F que hemos utilizado caben 0,4cc de suero.

1.4 Seguimiento

Los animales se vigilan de manera muy estrecha las primeras 72h desde la intervención, manteniéndoles una medicación analgésica según el protocolo descrito previamente y con la supervisión directa del personal veterinario del Departamento de Cirugía Experimental que siguieron sus protocolos habituales.

La alimentación a base de pienso de mantenimiento para cerdos (Panlab SAFE 127) se reintroduce al día siguiente de la intervención y se mantiene en la cantidad recomendada por el veterinario durante todo el seguimiento.

Un factor importante en la evolución es que el cerdo crece. El crecimiento de la aorta tiene las siguientes connotaciones:

- Cambios en la remodelación del saco aneurismático: no son comparables a los que tienen lugar en humanos (pacientes adultos)
- El crecimiento puede servir para valorar la adaptabilidad de la endoprótesis.
- El crecimiento puede favorecer la aparición de fugas del saco aneurismático (una de las complicaciones más frecuentes en la clínica).
- Puede permitirnos estudiar, en el periodo de seguimiento, cómo se comportan las células en una situación de crecimiento.

1.5 Estudio Histológico.

Una vez aislada la arteria con el aneurisma del animal sacrificado, se procedió a su perfusión mediante inmersión en una solución de formaldehído al 4% durante un mínimo de dos días. Posteriormente se retiró el stent mediante pinza quirúrgica y por último las muestras fueron embebidas en parafina para obtener

secciones longitudinales de 5-7 μm (figs. 9-11). Como tinción histológica se utilizó la técnica de tinción con hematoxilina/eosina según Ehrlich. A continuación, un patólogo experimentado realizó un estudio ciego de los cortes histológicos mediante microscopio óptico.



Figuras 9-11. Imágenes macroscópicas de la pieza donde se aprecia la disposición fusiforme del aneurisma doble. Corte transversal del aneurisma una vez extraída la endoprótesis, donde se aprecia el saco del aneurisma relleno de un tejido de consistencia elástica.

Para el estudio de inmunofluorescencia en la primera fase, los cortes histológicos se calentaron a 60°C durante 10 minutos antes de proceder a su desparafinado, sometiéndolos a lavados de xilol y posteriormente de alcohol de concentración decreciente hasta pasar, por último, a una cubeta de agua destilada. La autofluorescencia se inhibió mediante la incubación durante 10 minutos con borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) 4 mg/mL

en TBS 1X (Tris-base 0,05 M, NaCl 0,15 M en agua destilada) a pH 7,4-7,6. Tras varios lavados con TBS se procedió a incubar durante 30 minutos con una solución de bloqueo al 5% de suero normal de cabra y 0,05% de tritón X-100 en TBS para inhibir las uniones inespecíficas. A partir de entonces los anticuerpos primarios anti-GFP (SC-8334, Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.) diluidos 1:100 y se pre-trataron con tampón citrato (pH = 6) y se incubaron con tampón de bloqueo durante 1 h. Este paso fue seguido por un lavado y una incubación de una hora con el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE.UU.) diluido 1:200. Después se montaron con el reactivo de Antifade con tinción de Diaminofenilindol (DAPI Prolongación de Oro sondas moleculares; Eugene; Oregón, EE.UU.) Los resultados se analizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Leica AF6000 (Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim, Alemania) utilizando el programa LAS AF (Leica).

Lo ideal habría sido hacer cortes histológicos transversales del complejo aneurisma-aorta-endoprótesis para poder ver bien la disposición de las células dentro del saco (si se pegan al parche o al endotelio o si rellenan el saco o incluso si migran al interior de la pared arterial, de donde esperamos le lleguen los nutrientes). Lamentablemente no se encontró ningún sistema de corte capaz de incluir la pieza completa, con la endoprótesis puesta. Se trata de una prótesis con un esqueleto de acero muy resistente. Ningún microtomo conocido por nosotros es capaz de cortarlo (se consultaron diversas unidades de Anatomía Patológica y diversos grupos de investigación sin éxito). Una vez fijada la pieza en formol el stent recubierto se retira muy fácilmente y no parece arrastrar consigo tejido alguno, salvo la natural hiperplasia intimal-neoendotelio formado en su cara luminal, que no hemos podido analizar (macroscópicamente el aspecto y grosor de la misma no varía entre los especímenes tratados y los controles).

En esta primera fase se estudiaron de forma individualizada y ciega los especímenes por dos servicios diferentes de Anatomía Patológica: el del

Hospital Universitario La Paz y el del Hospital Universitario de La Princesa, ambos adscritos a la Universidad Autónoma de Madrid.

2. SEGUNDA FASE

2.1 Diseño Experimental

Para esta segunda fase se plantea un estudio de casos y controles 3/1 con tres periodos de seguimiento a uno, dos y tres meses. En esta segunda fase sólo se realiza un aneurisma en cada animal para evitar factores de confusión y para tener aneurismas más grandes. Tuvimos un éxito no previsto en cada grupo, por trombosis terminoaórtica, dos a las 24 horas (un caso y un control) y uno a la semana (caso) de seguimiento. Este hecho condicionó que intervinieramos un caso más para sacrificarlo a las 24 horas y completar un grupo de seguimiento a un día. Las variables de estudio fueron por un lado el estudio de imagen *in vivo* mediante Tomografía Computadorizada (CT) y mediante eco-doppler aórtico, la detección de las células troncales mediante inmunofluorescencia *in situ* y por otro lado el estudio histológico con diferentes tinciones específicas para valorar fibrosis, parámetros inflamatorios, calcificación, hemorragia y necrosis.

2.2 Aislamiento, cultivo, crecimiento, caracterización y localización celular.

Se realiza de la misma manera que para la fase primera, preparando 10 millones de células troncales mesenquimales para cada caso, pero esta vez se resuspenden en 2cc de Tissucol Duo.

Como ya se ha señalado antes, se decidió usar las células procedentes de un animal macho (XY) y realizar el procedimiento sobre animales hembra (XX) en lugar de utilizar células transfectadas con el lentivirus GFP. Posteriormente se analiza la existencia de células mediante el Kit ZytoLight porcine XY Dual Color Probe (Zytovision, Bremerhaven, Alemania) que detecta el cromosoma X y el

cromosoma Y porcino mediante hibridación fluorescente in situ sobre secuencias específicas (FISH).

El protocolo seguido para la realización del FISH fue el recomendado por la casa comercial con pequeñas modificaciones. El protocolo contempla tres pasos: *Desparafinación/proteólisis*, en que se incluyen los cortes histológicos en dos series de alcoholes (70, 90 y 100%), posteriormente se tratan a 98°C en una solución de ácido cítrico y después se lavan con los búferes incluidos en el kit. El segundo paso consiste en la *desnaturalización e hibridación* de las muestras. Para ello se añaden 10µl de la sonda Zytolight FISH específica, se sellan los cristales y se desnaturaliza la muestra a 77°C durante 10 minutos, luego se incuban los cristales a 37°C durante toda la noche. El tercer paso consiste en la *Post-hibridación/detección*, para ello se quitan los cubre objetos y se lava la muestra con los búferes del kit a 37°C durante 5 minutos, repitiendo el proceso y finalizando con una deshidratación con etanol a diferentes concentraciones antes de añadir durante 15 minutos 30µl de DAPI sobre las muestras y posterior lavado para eliminar el exceso. Por último se visualizan las muestras en el microscopio de fluorescencia teniendo en cuenta que el cromosoma Y se visualiza a una absorción de 503nm en color verde; el cromosoma X a una absorción de 547 nm en naranja y el DAPI en color azul a 418nm.

2.3 Intervención quirúrgica

Intervenimos 14 cerdos de la raza Large-White de unos 25 kg de peso, siguiendo el mismo protocolo probado en la primera fase con algunas modificaciones para optimizar la segunda parte del trabajo.

El protocolo anestésico no cambió salvo en el postoperatorio inmediato, que añadimos un tratamiento con heparina de bajo peso molecular, 3 dosis de 120mg enoxaparina sc cada doce horas. Esto se hizo para intentar evitar los temidos casos de trombosis terminoaórtica y para disminuir la hiperplasia intimal que se produce en el interior de la endoprótesis.

El procedimiento quirúrgico fue el mismo salvo que para la segunda parte del estudio se eliminó el posible factor de confusión que pudiera ser la contigüidad de los aneurismas caso y los aneurismas controles y se realizó un único aneurisma con parche de dacron de 4cm de largo por 1,5 de ancho, tanto para los casos como para los controles, de forma que además, tratamos aneurismas de mayor tamaño.

2.4 Seguimiento.

Se realizó un seguimiento a las 24h, una semana, uno, dos y tres meses. Los periodos de seguimiento mayores a un mes se hicieron en el Hospital Veterinario Sierra de Madrid de San Agustín de Guadalix por problemas de espacio en nuestro animalario y por el bienestar de los animales, ya que éstos multiplican por cuatro su tamaño en tres meses.

El protocolo de alimentación y el seguimiento clínico se hicieron exactamente igual y sólo se trasladaron los animales una vez pasados los primeros 4 días del postoperatorio inmediato y tras recuperar éstos su actividad y ritmo alimentario normales.

Realizamos un CT de control (Siemens Somaton 16CT, Berlin, Alemania) con contraste intravenoso (Iomeron 300, Rovi Madrid, España) a dosis de 1ml/kg, (venoclisis en ambas orejas, inyección manual) al final de cada periodo de seguimiento en los grupos de uno, dos y tres meses. No se realizó este CT en periodos más cortos porque en ellos no se esperan cambios sustanciales de la anatomía macroscópica. Al grupo de seguimiento de tres meses se le realizó un CT adicional al mes y a los dos meses, para tener de este grupo no sólo el CT final sino también una imagen radiológica de su evolución (fig. 12).

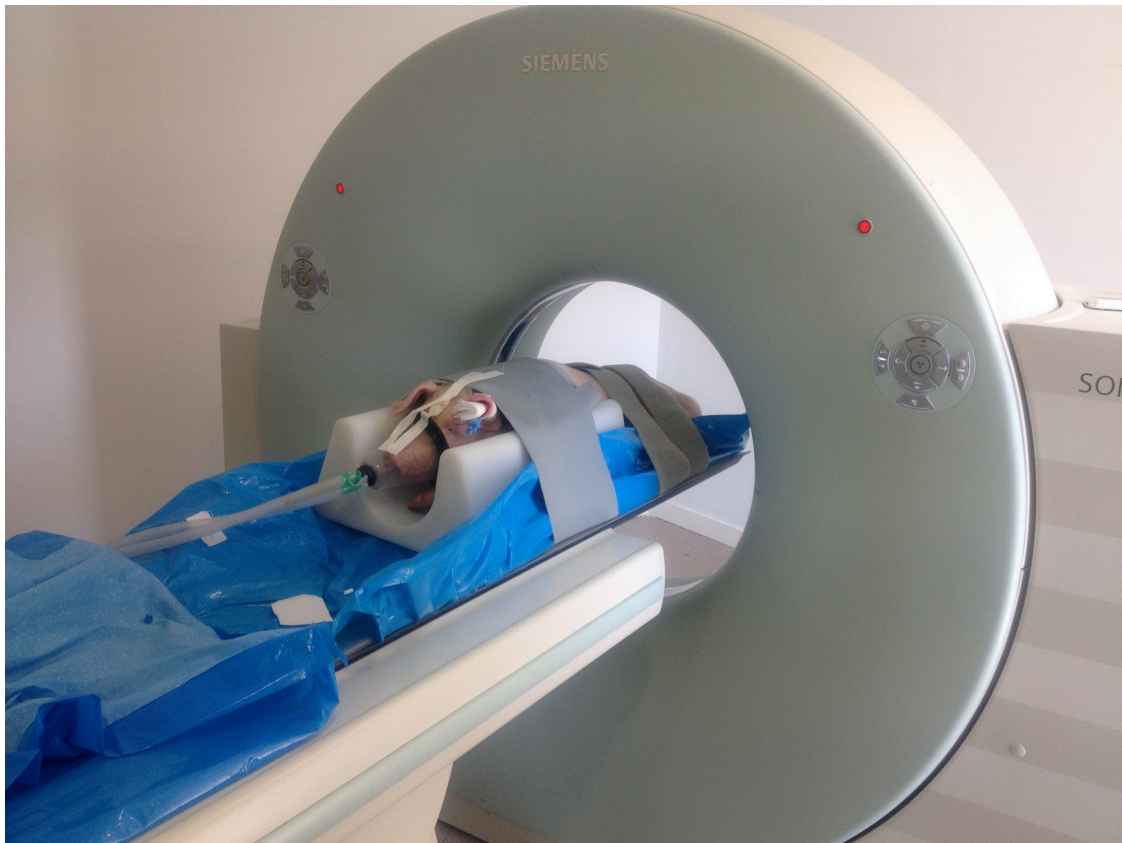


Figura 12. CT de seguimiento. Anestesia inhalatoria.

El sacrificio para la obtención de muestras se realizó previa reintervención quirúrgica (mismo protocolo anestésico) que permitió valorar *in vivo* la situación de los aneurismas casos y controles mediante laparotomía exploradora y eco doppler arterial intraoperatorio (Terason T3000, Burlington MA, EEUU, sonda de 7,5MHz) y comparar los hallazgos con el CT y la histología. Una vez recogidos estos datos y extraída la pieza *in vivo* se sacrifica al animal mediante inyección letal de cloruro potásico 5ml, bajo anestesia general.

2.5 Estudio Histológico.

En esta segunda fase las muestras fueron incluidas en formalina al 4% y enviadas al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Tajo (Aranjuez, Madrid); donde fueron analizadas por un patólogo ciego. Se realizó una sección longitudinal de la pared vascular para extraer el material protésico. Se realizaron cortes de 0,5 cm de sección transversal. Los cortes se procesaron y se incluyeron en parafina.

Se realizaron cortes histológicos con un espesor de 3 μm mediante microtomo y se procedió a su desparafinación y mantenimiento en estufa a 56° C. durante 30 minutos. Posteriormente y previa tinción con diversas técnicas (Hematoxilina-eosina, Giemsa, P.A.S (Ácido peródico de Schiff) y tricrómico de Masson). Estos cortes fueron estudiados mediante microscopia óptica.

En cada corte se estudiaron las siguientes características de la pieza:

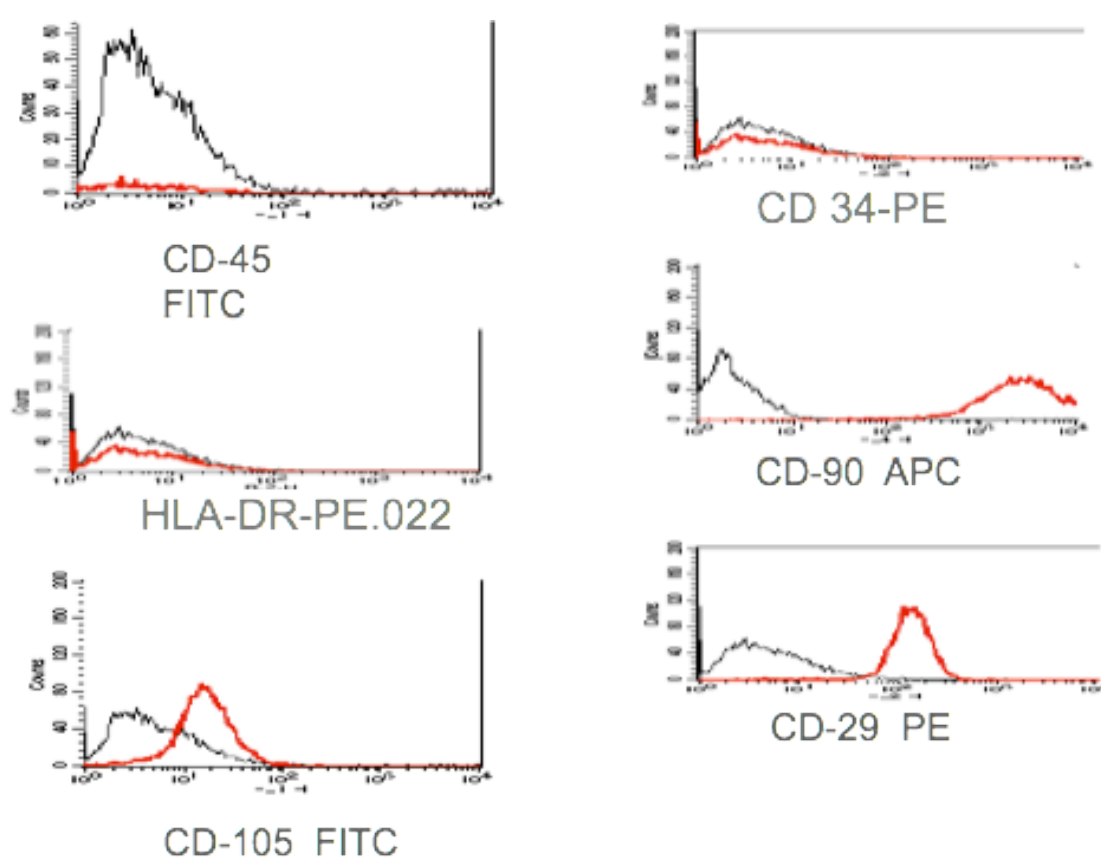
- 1) Hemorragia: se estudia el grado de hemorragia de la pieza, así como la formación o no de trombo en la zona dañada. Se valora en relación a la intensidad (<25%; 25-75%, >75%).
- 2) Neoformación de vasos: se estudia si en la zona dañada y en el trombo existe la neoformación de vasos sanguíneos. Esto ayuda al proceso inflamatorio y de regeneración. A mayor numero de vasos neoformados se presupone que ayudara a la inflamación y regeneración del daño causado.
- 3) Inflamación aguda: se mide el componente inflamatorio agudo (presencia de polimorfonucleares en el componente inflamatorio <25%; 25-75%, >75%).
- 4) Inflamación crónica: se mide la presencia de componente linfoide. Así mismo se valora la presencia de histiocitos en relación con la agresión, los cuales fagocitan emites o cuerpo extraños (histiocitos o linfocitos maduros en el componente inflamatorio <25%; 25-75%, >75%).
- 5) Necrosis: se valora la presencia e intensidad de tejido muerto.
- 6) Fibrosis: se valora la intensidad de la cicatrización como respuesta al daño causado.
- 7) Elástica: se observa la regeneración de la pared vascular con la presencia de la lámina elástica limitante interna.
- 8) Calcio: se observa el depósito de calcio en la pared vascular como respuesta a la inflamación y daño causado.

RESULTADOS

1. PRIMERA FASE.

1.1 Caracterización y diferenciación celular

Las células aisladas y cultivadas fueron analizadas por citometría de flujo mostrándose positivas para CD 29, CD90 y CD105 y negativas para CD 34, CD45 y HLA DR (fig. 13). No encontramos diferencias significativas en los marcadores de membrana entre las células antes del proceso de congelación y las células tras una semana en cultivos posterior a la descongelación.



Marcadores	Positivo %	Negativo %
CD29	89,33	10,67
CD34	0,07	99,93
CD 45	0	100
CD 90	99,96	0,04
CD 105	79,71	20,29
HLA-DR	0,4	99, 6

Figura 13. Citometría de flujo. Marcadores expresados por nuestras ASCs.

Las células se diferenciaron a adipocitos y osteocitos según los protocolos expuestos anteriormente. En ninguno de los ensayos realizados encontramos diferencias en la capacidad de diferenciación de las células pre y post congelación (figs. 14 y 15).

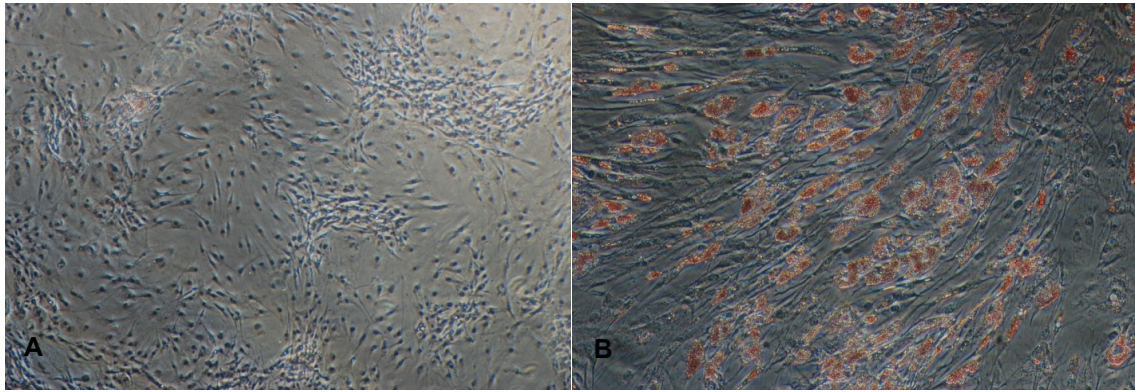


Figura 14. Diferenciación adipogénica. (A) Control. (B) Medio adipogénico (18 días).

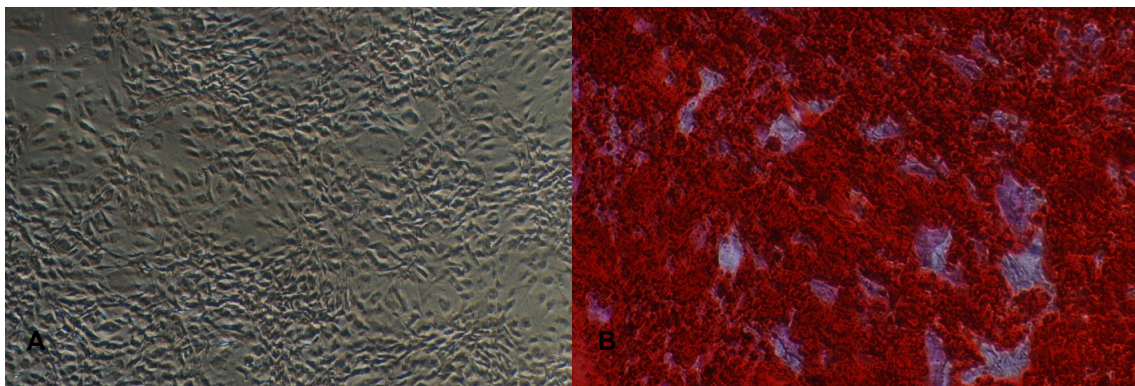


Figura 15. Diferenciación osteogénica. (A) Control. (B) Medio osteogénico (32 días).

1.2 Estudio Macroscópico.

Al reintervenir a los animales hemos encontrado la fibrosis postquirúrgica habitual, resultado de la cicatrización de los tejidos operados con anterioridad, especialmente y como es habitual en la clínica también en aquellos lugares donde se ha dejado material extraño, en este caso el Dacron (fig. 16).

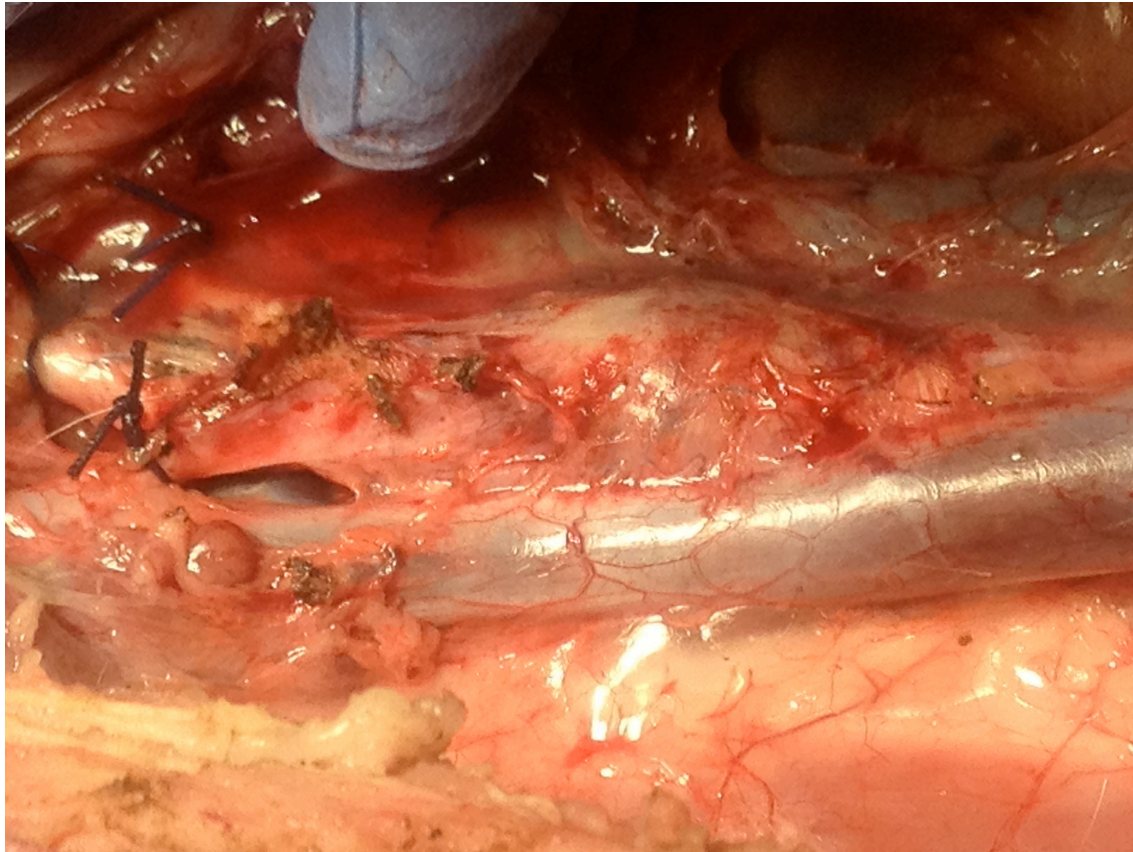


Figura 16. Fibrosis retroperitoneal sobre el parche de dacron.

Se ha presentado una única complicación en el postoperatorio inmediato. Un animal hubo de ser sacrificado a las 24 horas de su intervención por isquemia aguda de ambas extremidades. Al realizar la autopsia encontramos que la prótesis era corta, lo que condicionaba una fuga tipo I distal que en este caso provocó la exposición al torrente sanguíneo del pegamento de fibrina. Una vez pasado el efecto anticoagulante de la heparina administrada durante la intervención la fibrina indujo una trombosis arterial aguda terminoaórtica. Este hecho inesperado nos proporcionó un espécimen de aneurisma tratado de 24 horas de evolución, no previsto en nuestro diseño inicial pero que aprovechamos en todo caso. Por este motivo decidimos realizar un caso más para no descuadrar los tiempos de seguimiento previstos.

n	1	2	3	4	5	6
Peso	22kg	25kg	25kg	23kg	20kg	26kg
Dosis cel.	10	10	10	10	10	10
Sacrificio	24h	1semana	3semanas	5semanas	7semanas	9semanas
WG	6x5	7x5	7x5	8x5	8x5	8x5
Complics clínicas	Trombosis aórtica*	No	No	No	No	no
Histología Aneurisma tratado	Trombosis, hemorragia intrasaco	Infiltrado PMN (Inflamación aguda)	PMN + linfocitos	Infiltrado linfocitario leve (70linf/campo)	Células pseudo fusiformes (circunf)	Células pseudo fusiformes (circunf)
Histología Aneurisma control	Trombosis, hemorragia intrasaco	Infiltrado PMN (Inflamación aguda)	Más PMN que linfocitos	Infiltrado mayor (420linf/campo)	Infiltrado linfocitario	Fibrosis y neovasos
GFP	Positiva	Positiva	Positiva	Dudosa	Negativa	Negativa

Tabla 3. Muestra de la primera fase del estudio.

*Endoprótesis corta. Fuga tipo I distal con salida de fibrina a la bifurcación aórtica.

PMN: Polimorfonucleares. Circunf: disposición circunferencial. WG: Wallgraft (tamaño)

El resto de los casos tuvo un postoperatorio que podemos considerar normal: los cinco animales se levantaron sobre las cuatro patas la misma tarde de la cirugía y reanudaron la tolerancia oral esa tarde o la mañana siguiente (Tabla 3). Durante el periodo de seguimiento los animales permanecieron estabulados en el animalario del Hospital Universitario La Paz siguiendo una alimentación normal y sin encontrarse complicaciones a la exploración veterinaria. Todos los animales aumentaron considerablemente su tamaño y peso, aunque éste no fue registrado.

El cerdo genera una importante hiperplasia intimal en muy poco tiempo (vista a las 24 horas de la intervención) en comparación con el humano, situación que también se ha comprobado en otros estudios y que no parece tener relación con

las células troncales inyectadas, ya que se aprecia tanto en los casos como en los controles. Este hecho nos llevó a modificar un poco el tratamiento postoperatorio de la segunda fase, introduciendo tres dosis de heparina de bajo peso molecular (Enoxaparina 120mg/sc/24h)¹³³.

1.3 Estudio Histológico

La histología muestra un patrón de inflamación aguda que se va cronificando a lo largo del tiempo y termina con la fibrosis del saco aneurismático. Los cortes analizados con la técnica de Hematoxilina eosina muestran un infiltrado polimorfonuclear. Este infiltrado se va transformando en linfocitario, y lo hace antes en los aneurismas tratados que en los controles. Posteriormente deriva en una fibrosis más clara en los controles mientras que en los casos, además de fibrosis, se describe una disposición pseudo-circunferencial de las células dentro del saco (fig. 17). Con esta técnica no se puede determinar poblaciones celulares distintas entre ambos grupos, pero sí se ve una mayor celularidad fusiforme y menor cantidad de linfocitos en el seno del pegamento de fibrina que tenía células en comparación con el control. En el estudio de inmunofluorescencia se detectaron células troncales en el saco aneurismático hasta las 3 semanas posteriores a la inyección (fig. 18). El análisis de las muestras de más de 5 semanas no nos ha permitido identificar sobre los cortes células GFP positivas, aunque tampoco podemos descartar su existencia.

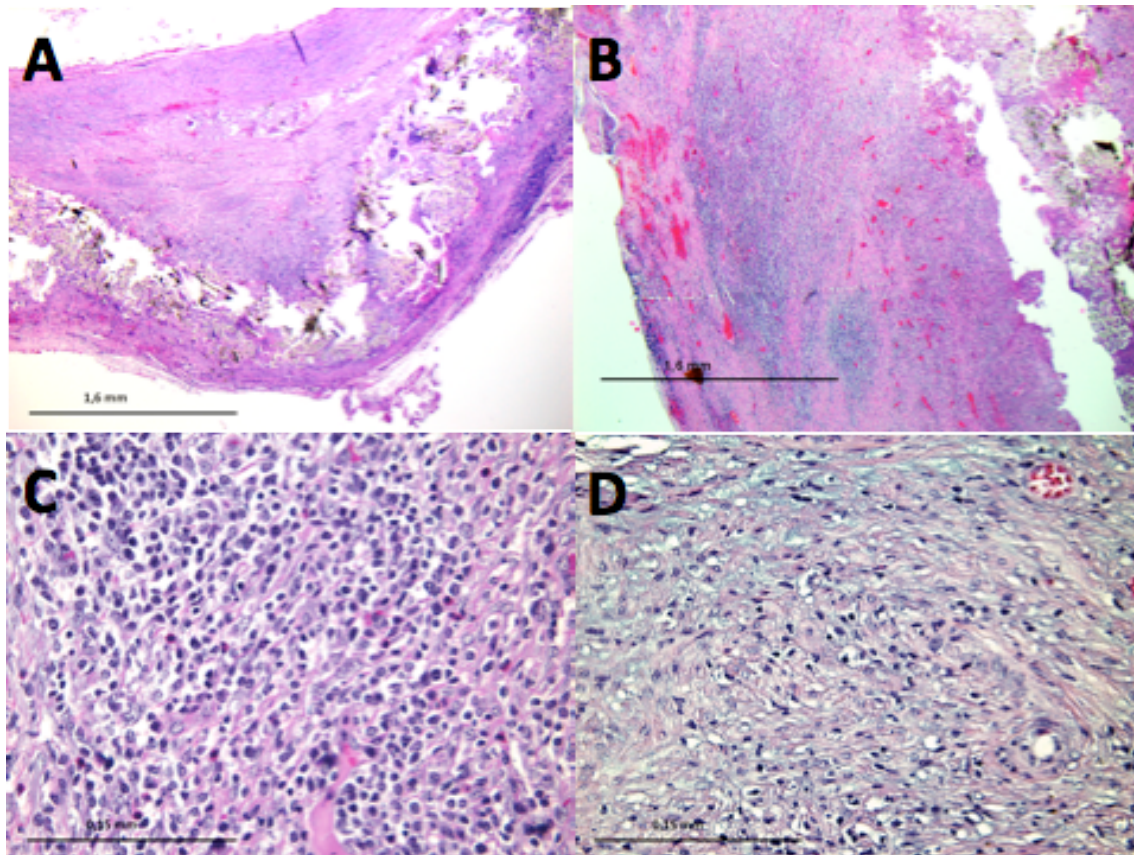


Figura 17. Aneurisma tratado. (A) Pared arterial tratada con células madre con el parche de Dacron. Presenta cambios regenerativos y una inflamación linfocitaria leve. Hematoxilina-eosina x4. (B) Aneurisma control sin células madre. Presenta cambios regenerativos y un gran infiltrado inflamatorio linfocitario. Hematoxilina-eosina x4. (C) Aneurisma control. Abundante celularidad linfocitaria con un recuento de 420 linfocitos por campo de gran aumento. Hematoxilina-eosina x40. (D) Aneurisma tratado con células madre. Reacción linfocitaria menor con un recuento de 70 linfocitos por campo de gran aumento. Hematoxilina-eosina x40.

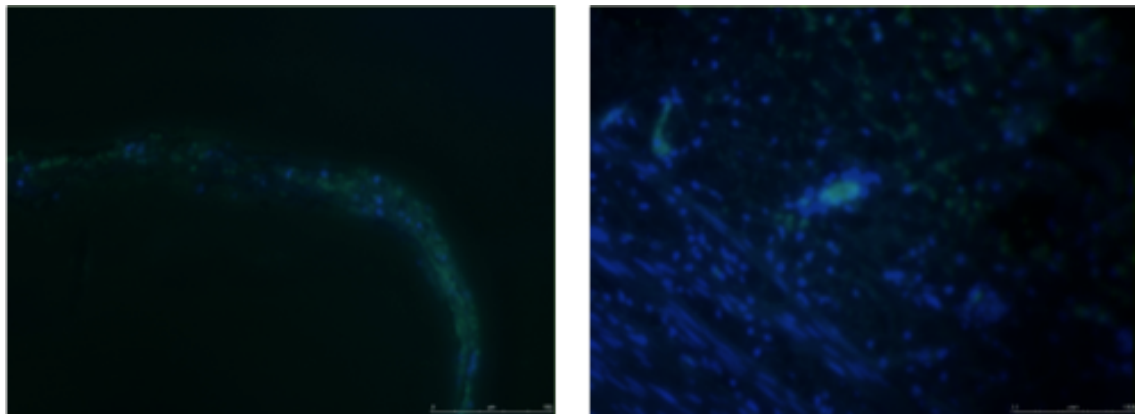


Figura 18. Inmunofluorescencia frente a GFP (en verde) y marcaje con DAPI (azul) de los núcleos celulares. (A) Disposición de las células implantadas a 3 semanas bordeando el saco aneurismático (x10). (B) Ampliación de la región central de la foto A donde observamos 2 células GFP positivas (x100).

En los cortes de hematoxilina eosina destaca una disposición fusiforme de las células del saco aneurismático en la dirección circular de la sección del vaso que se asemeja a la capa media adyacente, pero sin que hayamos podido comprobar la migración de estas células hacia su interior con las técnicas de marcaje empleadas, pero no encontramos otra explicación a esta disposición que encontramos sólo en los casos tratados y no en los controles que no sea otra que se trate de las células implantadas o descendientes de éstas con un grado mayor o menor de diferenciación (fig. 19).

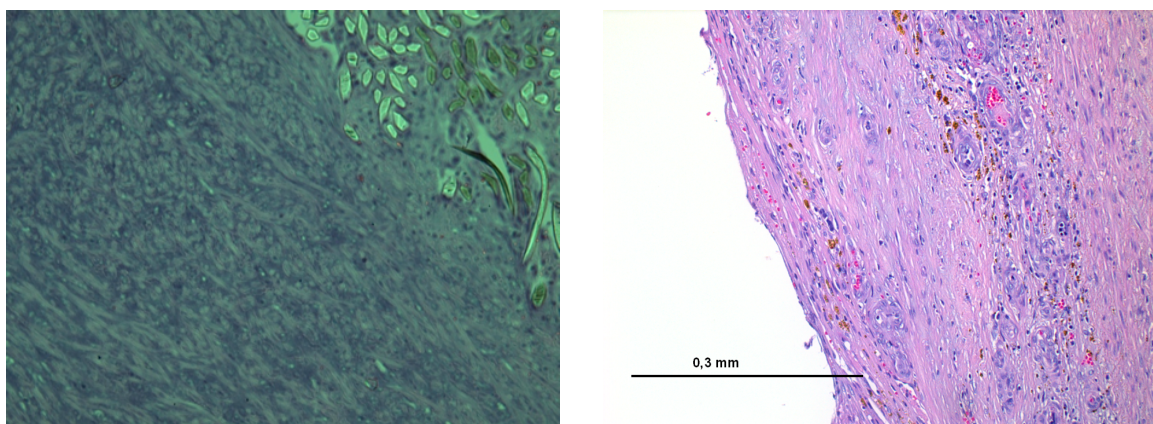


Figura 19. Presencia de células reparativas fusiformes de disposición concéntrica en la capa media neoformada, adyacente al parche de Dacron en la pared de un vaso tratado con células troncales mesenquimales. (A) Hematoxilina eosina x20. (B) Hematoxilina eosina x4.

2. SEGUNDA FASE.

Para la segunda fase se planificó intervenir a 10 animales, un macho para la extracción celular y el resto hembras para el análisis. Tres grupos de tres animales cada uno, un control (sin células) por cada caso (con células). Tres animales murieron a las 24h del procedimiento por trombosis terminoaórticas, uno a causa de salida de pegamento de fibrina del saco aneurismático (posible defecto técnico) y dos atribuidos al estado de hipercoagulabilidad típico de estos animales. Estos tres animales acabaron constituyendo un grupo adicional no previsto de dos casos y un control. Otro animal (tratado con células) falleció a la semana del procedimiento por isquemia de una pata trasera, posiblemente por embolización de pegamento de fibrina (defecto técnico) y también se incluyó en el análisis de resultados, constituyendo una n final de 14 animales.

2.1 Estudio Macroscópico.

En la segunda serie del trabajo tampoco hemos encontrado diferencias subjetivas en cuanto a las adherencias de la aorta operada.

También hemos observado una menor hiperplasia intimal (subjetivamente, no cuantificada) con el uso de heparina de bajo peso molecular en el postoperatorio inmediato. Al no poder incluir en los cortes histológicos la endoprótesis no hemos podido cuantificar este punto, pero se correlaciona bien con numerosas publicaciones que hasta la fecha relacionan el uso de heparina de bajo peso molecular con la disminución de la hiperplasia¹³⁴.

Grupo de Seguimiento de 24h.

Este grupo no previsto inicialmente se formó por la muerte de los animales en el postoperatorio inmediato, todos ellos debidos a una trombosis término-aórtica por fuga de fibrina al torrente sanguíneo (fuga tipo I distal) en dos casos y por descolgarse la endoprótesis hacia las iliacas en el tercero. En todos ellos se habían introducido células troncales en el saco aneurismático. El sacrificio hubo de hacerse a las 24 horas del procedimiento (Tabla 4).

N	2	3	4
Peso	23	25	25
Dosis cel.	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
WG	6x7	7x5	8x5
Complics. Clínicas	Trombosis aórtica*	Trombosis aórtica**	Trombosis aórtica**
Hemorragia	>75%	>75%	>75%
Trombo	NO	>75%	>75%
Infl. Aguda	25-75%	>75%	>75%
Infl. Crónica	NO	NO	<25%
Necrosis	SÍ	SÍ	SÍ
Hemosiderosis	NO	NO	NO
Neovasos	NO	NO	NO
Fibrosis	NO	NO	NO
Calcio	NO	NO	NO
Elástica interna	NO	NO	NO

Tabla 4. Grupo no previsto de sacrificio a las 24h. Tres casos tratados con células.

*Endoprótesis descolgada hacia la bifurcación iliaca.

**Endoprótesis corta. Fuga tipo I distal con salida de fibrina a la bifurcación aórtica.

Infl. Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl. Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Grupo de seguimiento de una semana.

Este grupo, tampoco previsto inicialmente se constituyó a raíz de la muerte de un caso a la semana del procedimiento. El animal se levantó adecuadamente la noche de la intervención y reanudó dieta pero no recuperó la movilidad completa de una extremidad, que se apreciaba fría y con un parcheado cianótico que no terminaba de mejorar, por lo que se decidió sacrificarlo a la semana de seguimiento ante la duda razonable de estar ante un sufrimiento inadecuado del animal. En la autopsia se apreció una correcta permeabilidad iliaca común pero con trombosis de iliaca externa derecha, posiblemente por embolización de fibrina o lesión arterial durante el clampaje del procedimiento inicial que condicionara la trombosis arterial secundaria. El otro caso que utilizamos a modo de control en este periodo es el primer animal operado y del que se extrajo la grasa abdominal para la obtención de todas las células troncales del estudio. Este caso no tuvo ningún problema en el postoperatorio inmediato (Tabla 5).

N	1	5
Peso	26	22
Dosis cel.	NO	10 ⁷
WG	8x5	8x5
Complics Clínicas	Extracción celular	Trombosis MID*
Hemorragia	25-75%	25-75%
Trombo	<25%	<25%
Infl. Aguda	>75%	25-75%
Infl. Crónica	NO	25-75%
Necrosis	SÍ	SÍ
Hemosiderosis	NO	<25%
Neovasos	<25%	25-75%
Fibrosis	NO	NO
Calcio	NO	NO
Elástica interna	NO	NO

Tabla 5. Grupo no previsto de sacrificio a la semana. En rojo control sin células y en negro animal tratado con células.

*Posible embolización de fibrina con trombosis arterial subaguda de eje iliacofemoral derecho.

Infl. Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Grupo 1: casos y control con seguimiento a un mes.

El grupo de seguimiento a un mes se estableció en la clínica veterinaria de San Agustín de Guadalix desde la semana siguiente a la intervención (se siguieron los 4-7 primeros días postoperatorios en el animalario del Hospital). Los tres animales ganaron peso y tuvieron un desarrollo normal para su edad. Se realizó un CT con contraste intravenoso previo al sacrificio en el mismo centro y un eco doppler intraoperatorio antes de extraer la pieza y sacrificar al animal (Tabla 6, Fig. 20).

N	6	7	8
Peso	30	25	27
Dosis cel.	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
WG	10x5	7x7	8x5
Complics Clínicas	No	No	No
Hemorragia	25-75%	<25%	<25%
Trombo	>75%	25-75%	25-75%
Infl Aguda	25-75%	<25%	<25%
Infl Crónica	25-75%	>75%	>75%
Necrosis	SÍ	NO	NO
Hemosiderosis	<25%	25-75%	25.75%
Neovasos	25-75%	<25%	25-75%
Fibrosis	NO	<25%	<25%
Calcio	SÍ	SÍ	NO
Elástica interna	NO	NO	NO

Tabla 6. Grupo 1. Sacrificio al mes. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

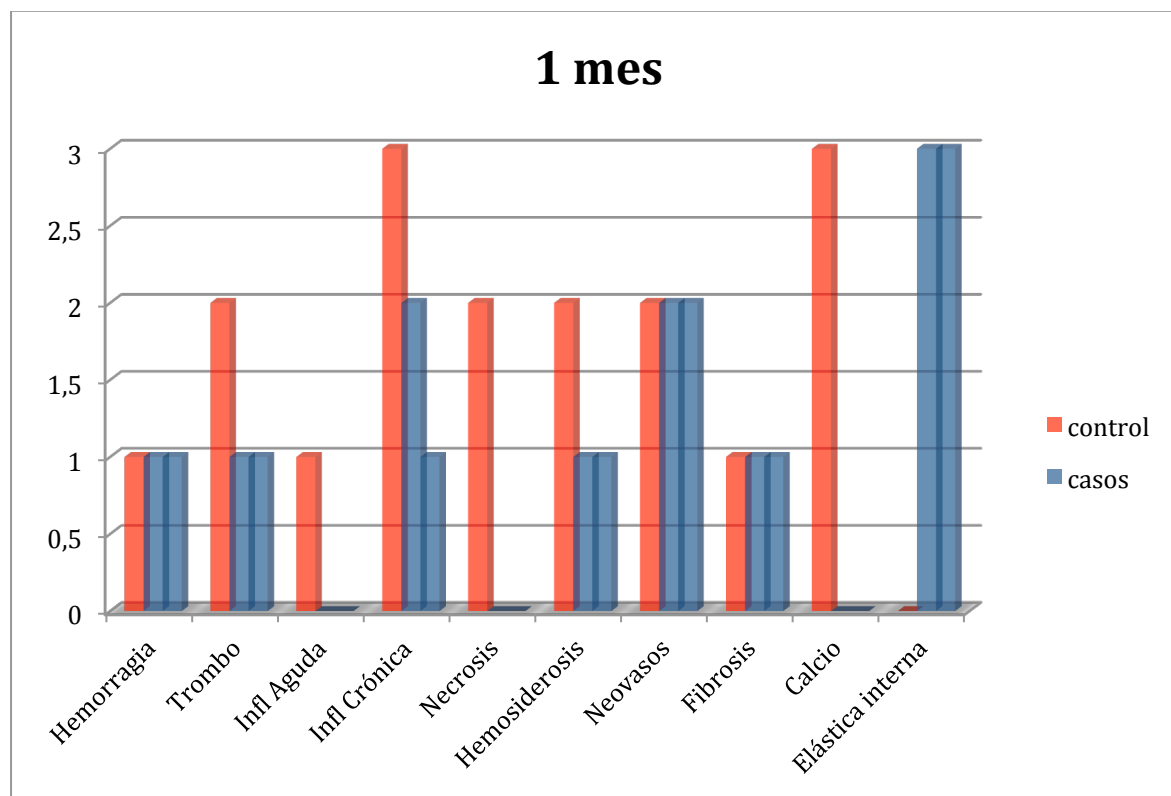


Figura 20. Grupo 1. Sacrificio al mes.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-trombo.

Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1=<25%; 2=25-75%; 3=>75%).

Grupo 2: casos y control con seguimiento a dos meses.

De la misma manera que el grupo anterior, los animales se estabularon en el postoperatorio inmediato en La Paz y fueron trasladados posteriormente al Hospital Veterinario donde completaron un seguimiento de dos meses sin alteraciones en el desarrollo o comportamiento valoradas por los veterinarios de ese centro. De la misma manera que en el grupo anterior se realizaron CT con contraste intravenoso antes de trasladarlos de nuevo a La Paz para su sacrificio (Tabla 7, Fig. 21).

N	9	10	11
Peso	22	23	28
Dosis cel.	NO	10 ⁷	10 ⁷
WG	6x7	8x5	8x5
Complics	No	No	No
Clínicas			
Hemorragia	<25%	<25%	<25%
Trombo	25-75%	<25%	<25%
Infl Aguda	<25%	NO	NO
Infl Crónica	>75%	25-75%	<25%
Necrosis	SÍ	NO	NO
Hemosiderosis	25-75%	<25%	<25%
Neovasos	25-75%	25-75%	25-75%
Fibrosis	<25%	<25%	<25%
Calcio	SÍ	NO	NO
Elástica interna	NO	SÍ	SÍ

Tabla 7. Grupo 2. Sacrificio a los dos meses. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

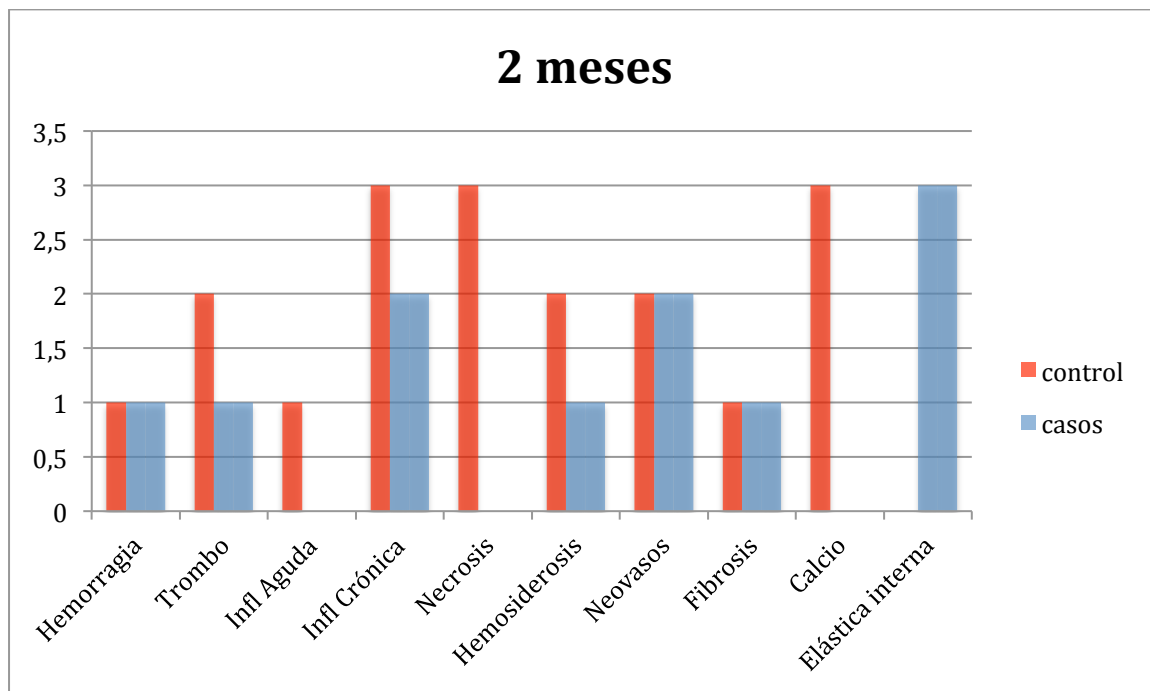


Figura 21. Grupo 2. Sacrificio a los dos meses.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-trombo.

Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1=<25%; 2=25-75%; 3=>75%).

Grupo 3: casos y control con seguimiento a tres meses.

El protocolo quirúrgico y de seguimiento fue exactamente igual a los grupos previos, sin cambios clínicos o problemas de crecimiento (Tabla 8). El peso aproximado final que alcanzaron estuvo en torno a los 80kg. Aunque clínicamente no sospechamos nada, en un caso hemos encontrado una complicación que podría estar relacionada con la primera intervención. La anulación de un riñón en el CT que resultó ser una pielonefritis, con aumento de tamaño del riñón a expensas de varias colecciones de material purulento y dilatación de la vía excretora que se encontraba íntimamente adherida al saco aneurismático. El animal, seguido hasta los tres meses, creció a ritmo normal y no se detectó ninguna alteración de su hábito alimentario o del comportamiento, siendo el problema renal un hallazgo inesperado (fig. 23).

N	12	13	14
Peso	25	25	27
Dosis cel.	NO	10 ⁷	10 ⁷
WG	10x5	10x5	8x5
Complics Clínicas	No	Pielonefritis*	No
Hemorragia	<25%	NO	NO
Trombo	NO	NO	NO
Infl Aguda	NO	NO	NO
Infl Crónica	25-75%	NO	NO
Necrosis	NO	NO	NO
Hemosiderosis	>25%	NO	NO
Neovasos	NO	NO	NO
Fibrosis	<25%	>75%	>75%
Calcio	SÍ	NO	NO
Elástica interna	NO	SÍ	SÍ

Tabla 8. Grupo 3. Sacrificio a los tres meses. En rojo control sin células y en negro animales tratados con células

*Pielonefritis detectada en el CT y necropsia, sin correlato clínico.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

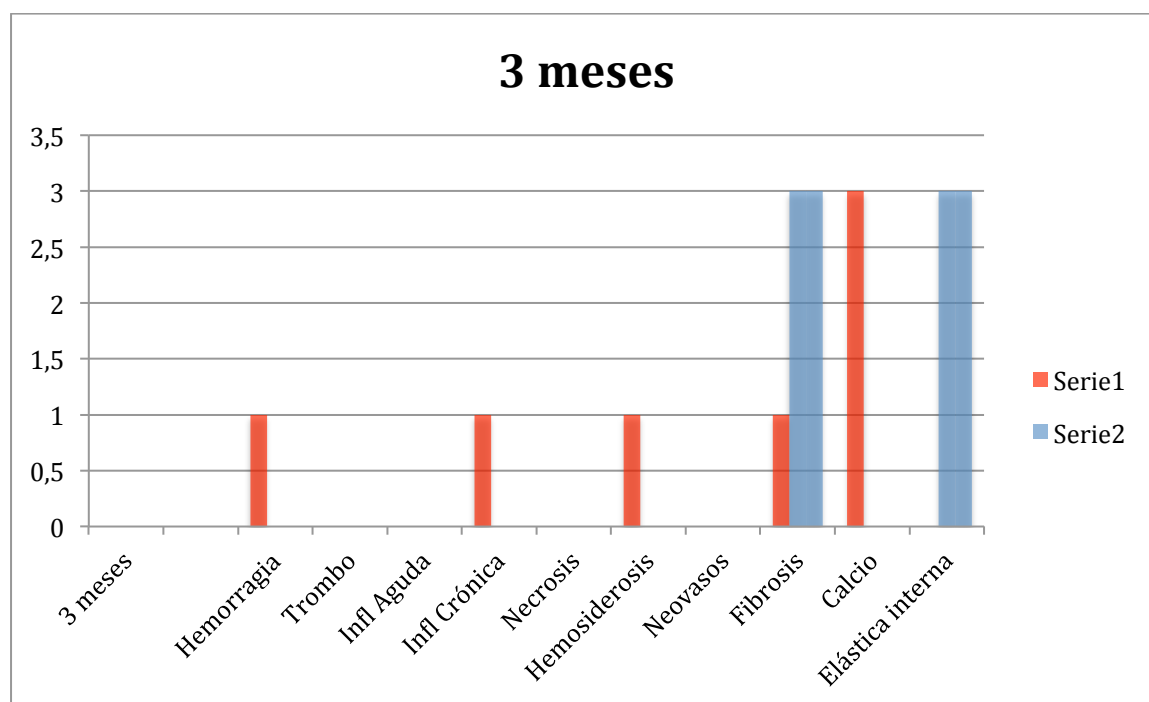


Figura 22. Grupo 3. Sacrificio a los tres meses.

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.

Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas.

Hemorragia-Trombosis: Presencia de hematíes-trombo.

Calcio/Elástica/Necrosis: presencia o no de ellos. (1=<25%; 2=25-75%; 3=>75%).

2.2 Pruebas de Imagen (CT y Eco Doppler).

Podríamos calificar todos los CT como normales. No encontramos diferencias entre los casos y los controles en ningún periodo de seguimiento, con ausencia de fugas o pseudoaneurismas. Todos los aneurismas se encontraban perfectamente excluidos.

Es importante reseñar que se trata de animales con un crecimiento muy rápido (pasan de 25kg a 80kg en tres meses). Este hecho supone un aumento del tamaño de la aorta de hasta el 40%. A pesar de ello, no hemos encontrado cambios significativos entre los casos y los controles, debido a que la endoprótesis se ha adaptado perfectamente a este cambio de diámetro, gracias a la sobredimensión de estos diámetros en el procedimiento inicial. Este aumento de diámetro se acompaña necesariamente de un acortamiento de la endoprótesis y un peor anclaje a la pared aórtica, pero no hemos comprobado la existencia de migraciones significativas o de fugas detectables en las pruebas de imagen.

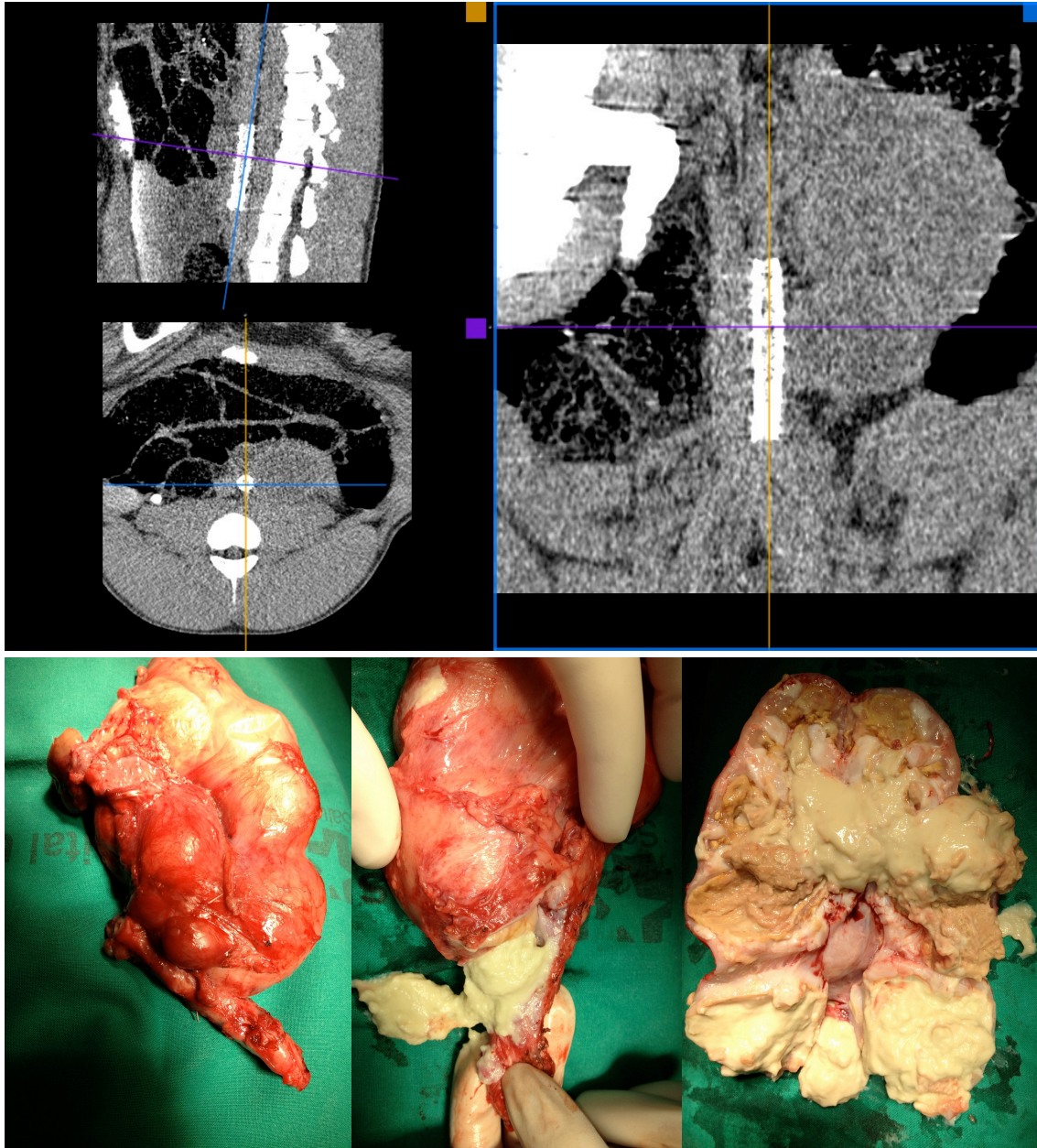


Figura 23. Pielonefritis y anulación de la función de un riñón en relación con la intervención, por posible infección relacionada con el parche de protésico.

Previo al sacrificio del animal se complementó la información de las imágenes del CT con la obtención de Eco-doppler intraoperatorios que no mostraron tampoco la existencia de fugas ni migraciones y sí una adecuada permeabilidad de las endoprótesis (figs. 24 y 25).

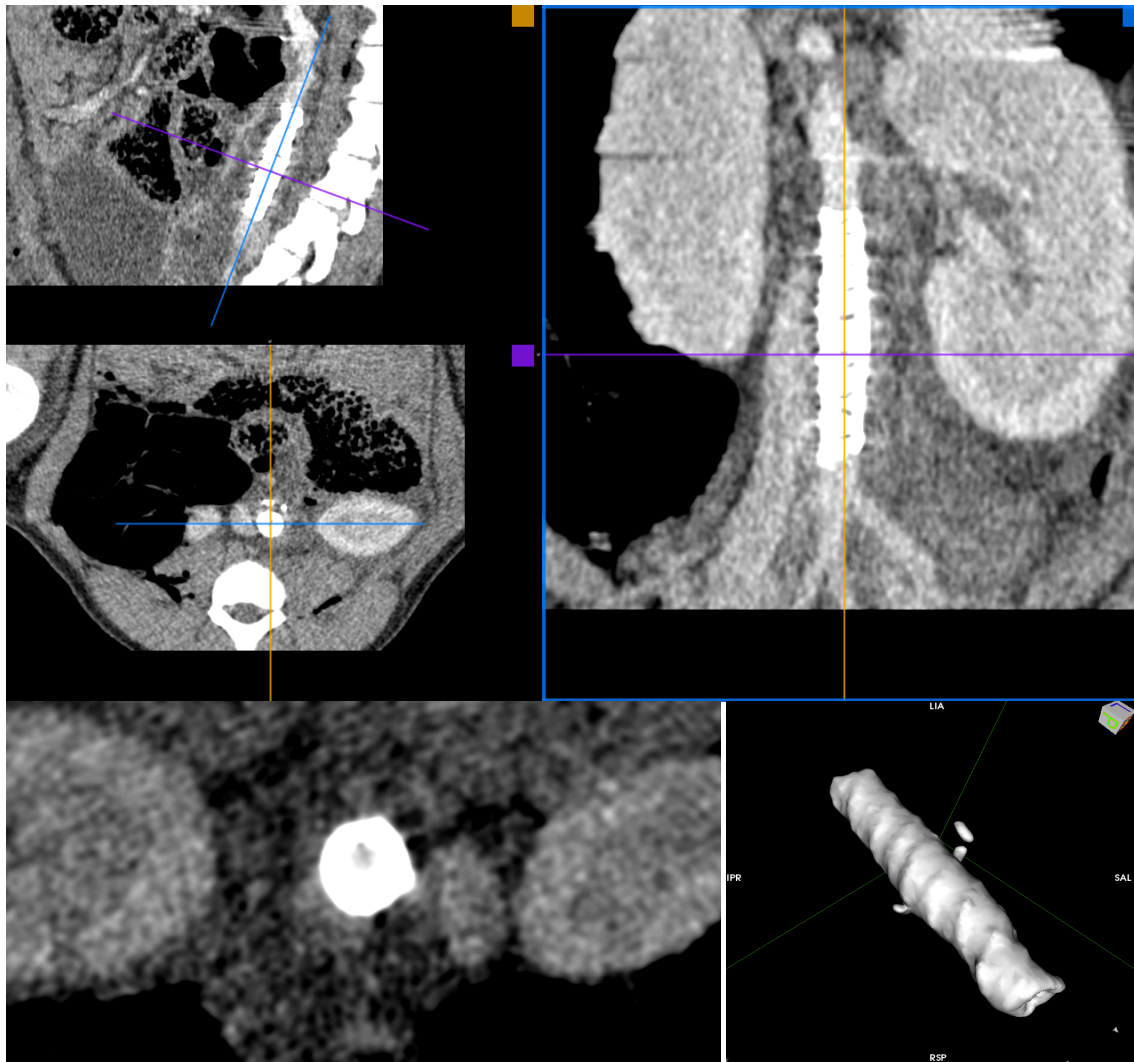


Figura 24. CT en tres planos y reconstrucciones tridimensionales de la endoprótesis

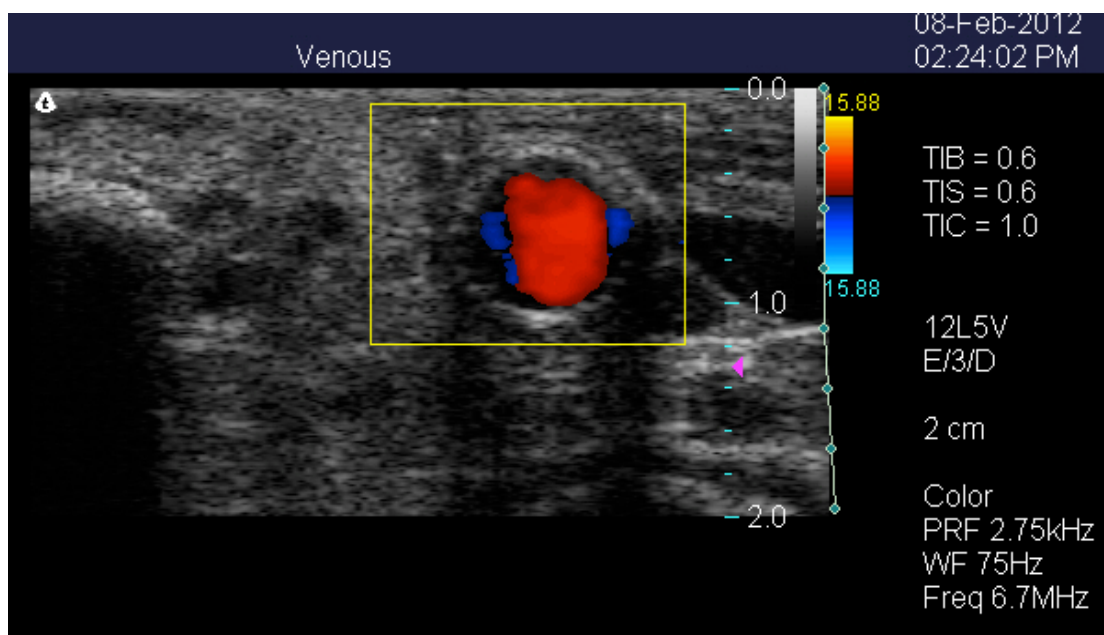


Figura 25. Eco doppler intraoperatorio (pre-sacrificio).

2.3 Estudio Histológico.

Los hallazgos histológicos se resumen en las Tablas 4-8. Distinguimos tres grupos de parámetros subjetivos: el daño inicial, la respuesta inflamatoria a este daño y los parámetros de reparación del daño.

La necrosis, la hemorragia y la presencia de trombo reciente son datos de un daño arterial directo y agudo como es la sutura del parche de dacron. Como es lógico, estos parámetros se observan en los periodos más cortos de seguimiento y van desapareciendo con el tiempo. Sin embargo hay cierta correlación entre su desaparición y el tratamiento con células troncales, ya que en los casos tratados desaparecen antes (figs. 26-28). De manera similar se advierte cómo los parámetros de inflamación aguda y crónica se correlacionan con el tiempo pero se acortan antes en los casos tratados con células que en los controles. En los casos la inflamación aguda dura menos y se llega a una situación de cronicidad antes (figs. 29 y 30). Igualmente la fase de inflamación crónica dura menos en los casos tratados con células y se llega antes a una situación final de *no inflamación* (fig. 31). De manera similar la reacción a cuerpo extraño es menor en los casos tratados (fig. 32). No encontramos una clara correlación en el tiempo entre los casos y los controles en cuanto a la neoformación de vasos. Sí parece que la necrosis se relaciona con el tiempo y, de nuevo, con el uso de las células madre, que podrían tener un efecto modulador sobre la misma, ya que existe menos necrosis en los casos de seguimiento corto e intermedio e igual necrosis en el largo plazo.

Por último los resultados del grupo de parámetros regenerativos muestran que la fibrosis del saco aneurismático está claramente relacionada con el tiempo pero sobretodo con el uso de las células madre (fig. 33). De la misma manera, aunque de forma inversa, la presencia de calcio como respuesta al daño es menor en los casos tratados con células que en los controles (figs. 34 y 35). El dato más llamativo que hemos encontrado, junto a la ausencia de depósitos de calcio, es una clara relación entre la regeneración de la elástica interna y el uso

de las células madre, ya que ésta sólo se detecta en los casos tratados con ellas y no en los controles en los tiempos analizados (figs. 36 y 37).

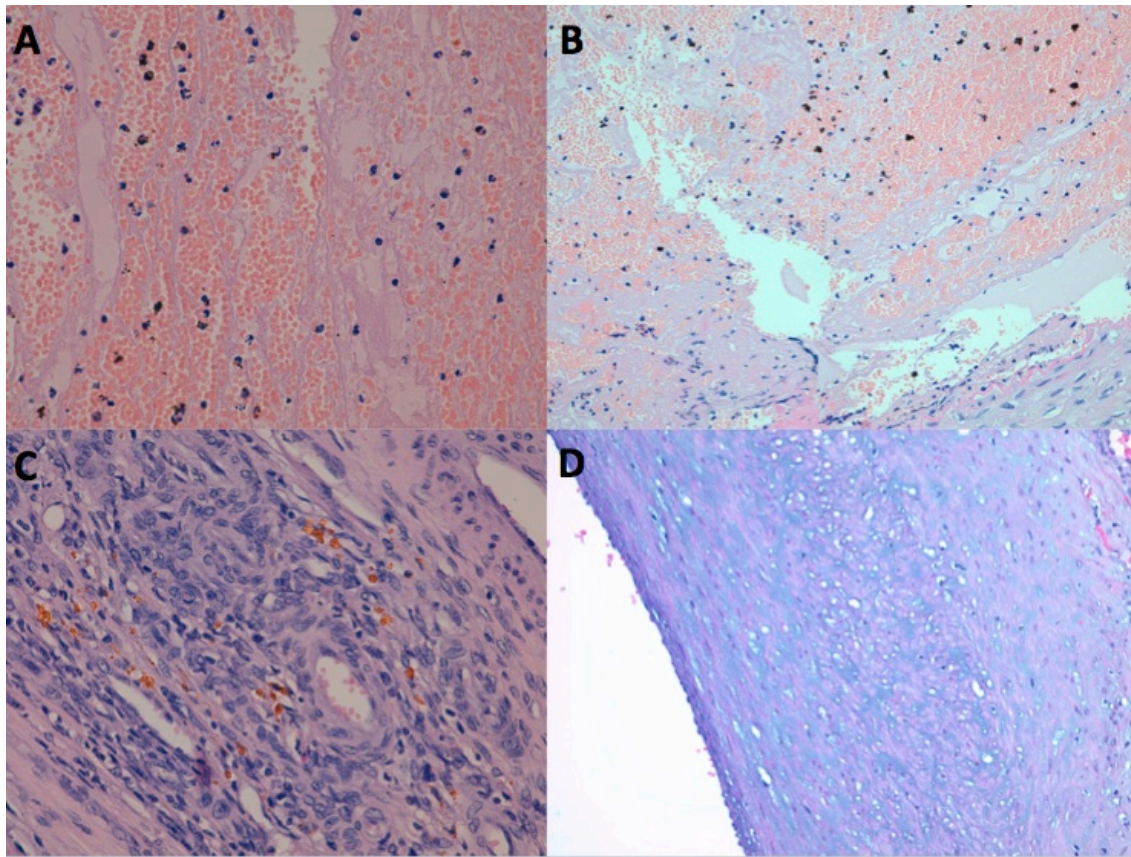
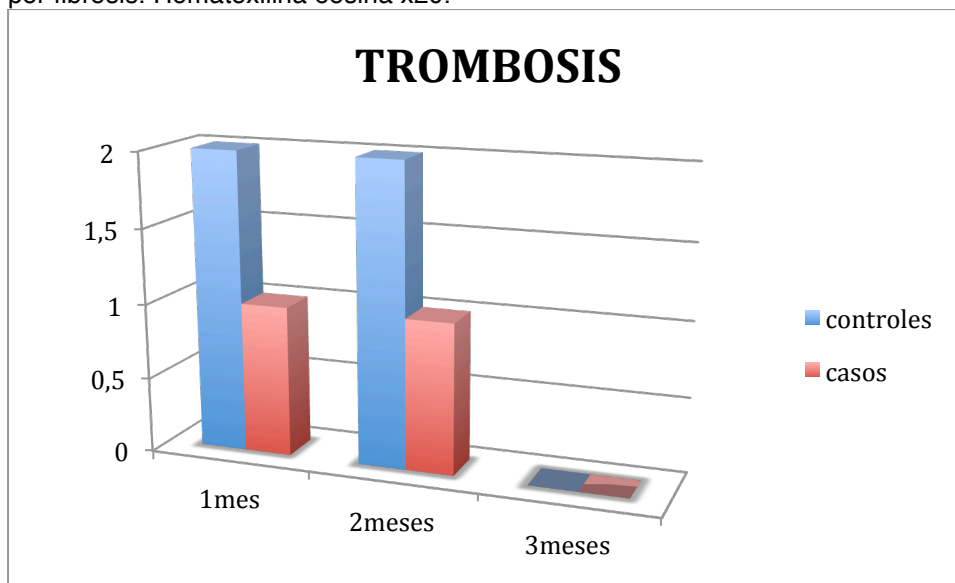


Figura 26. Hemorragia-Trombo. Animales tratados con células troncales mesenquimales. (A) Un día de seguimiento: hemorragia en la luz arterial, fibrina y presencia de células inflamatorias. Hematoxilina eosina x40. (B) Una semana de seguimiento: formación de trombo con fibrina. Hematoxilina eosina x40. (C) Un mes de seguimiento: trombo con neoformación vascular. Hematoxilina eosina x40. (D) Dos meses de seguimiento: desaparición del trombo y sustitución por fibrosis. Hematoxilina eosina x20.



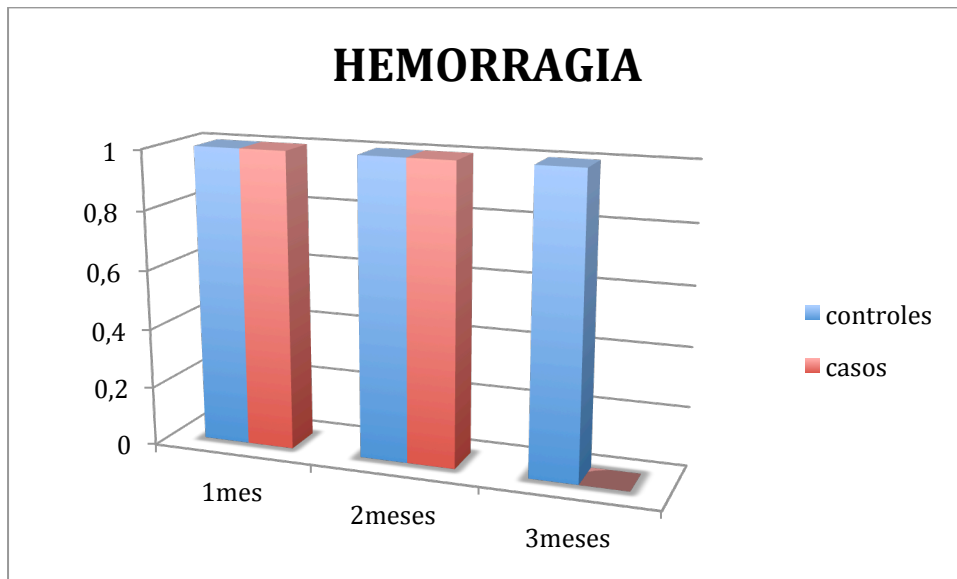


Figura 27. Gráfico que representa la presencia de Hemorragia-Trombosis en los grupos de tratamiento.

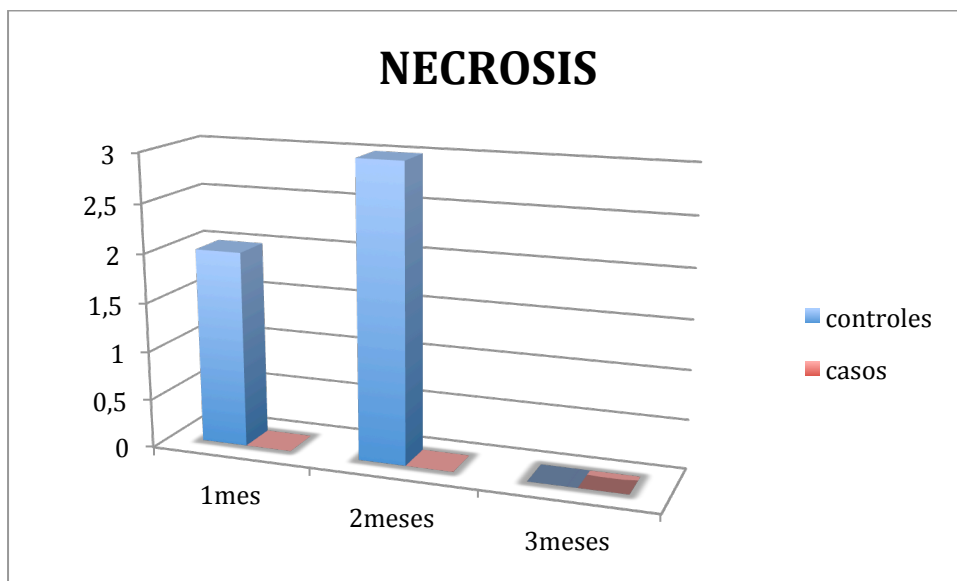


Figura 28. Gráfico que representa la presencia de necrosis tanto en los casos como en los controles.

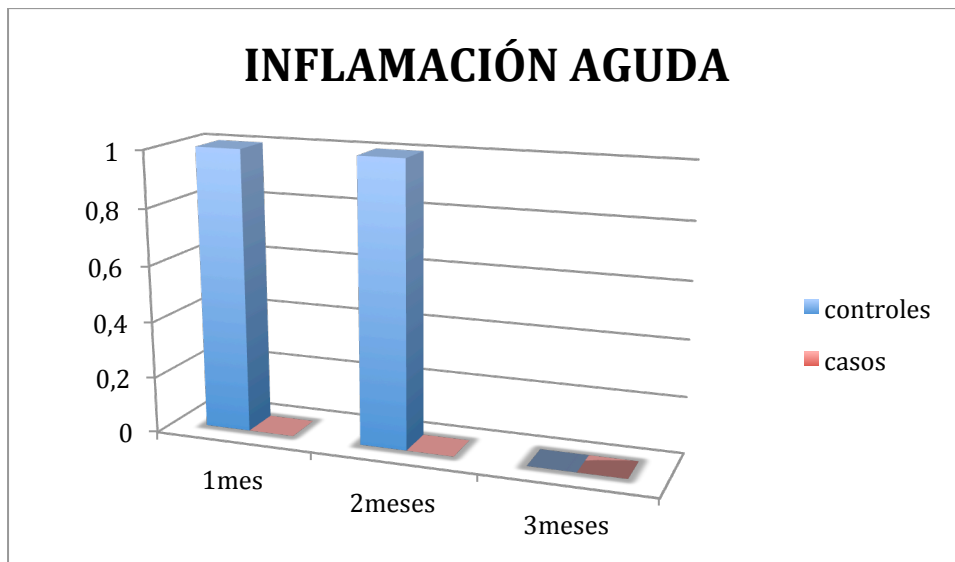
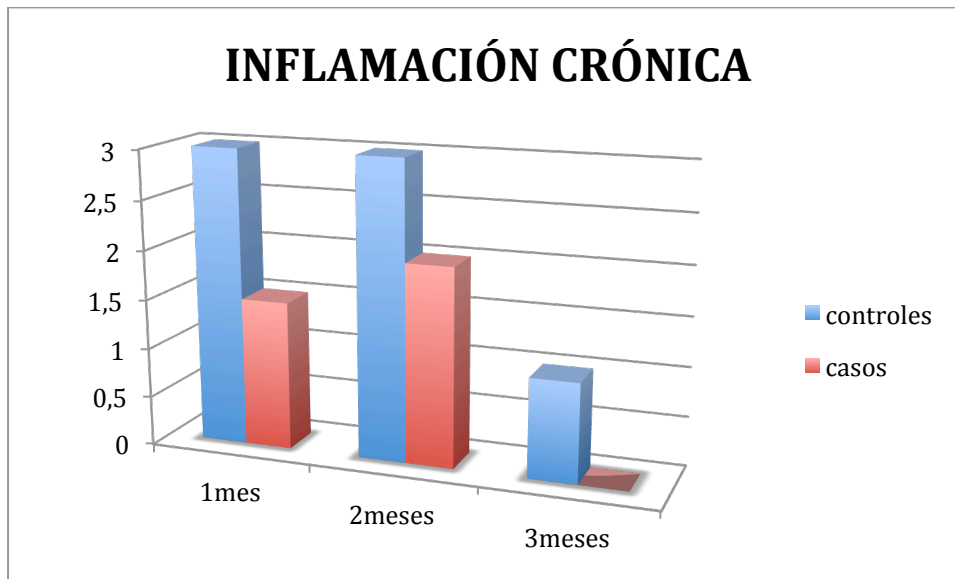


Figura 29. Gráficos donde se expresa la valoración histológica ciega de la inflamación en los casos y los controles (expresado en datos acumulativos).

Infl Aguda: Presencia de células inflamatorias, % polimorfonucleares.

Infl Crónica: Presencia de células inflamatorias, % linfocitos maduros y células plasmáticas.
(1=<25%; 2=25-75%; 3=>75%).

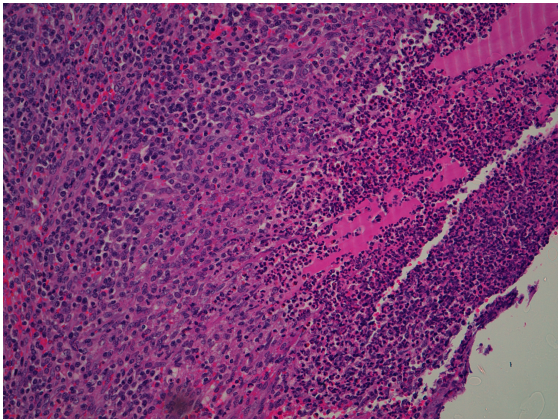
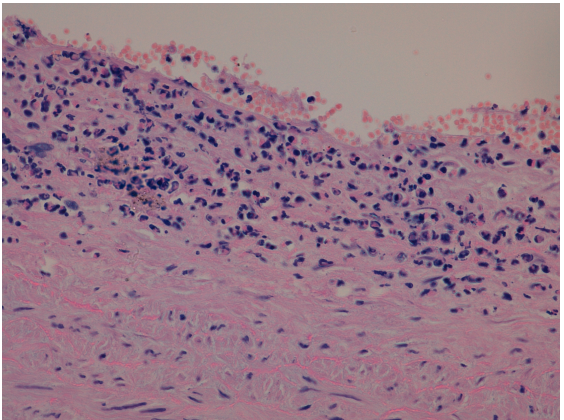
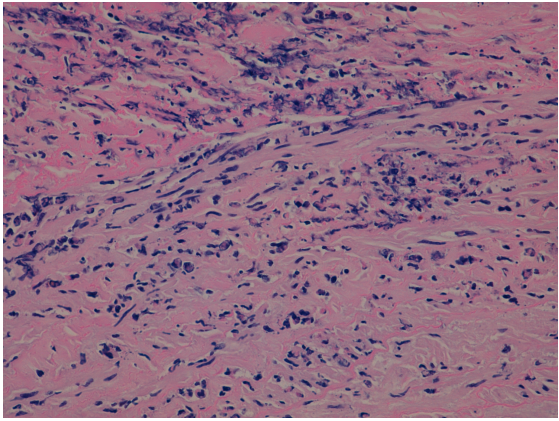
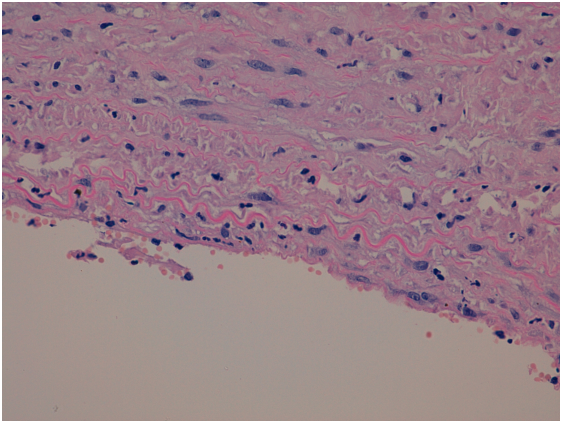
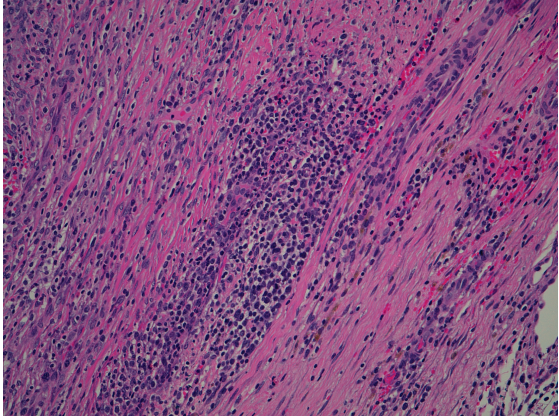
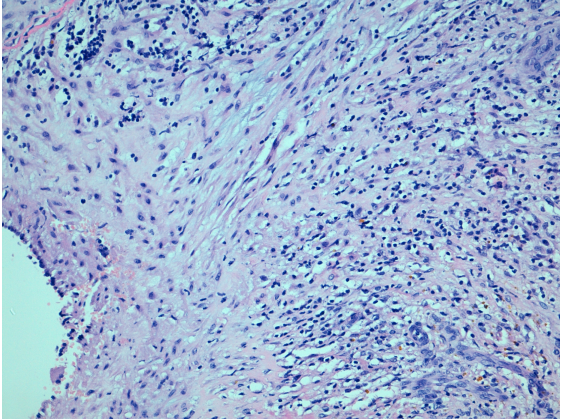
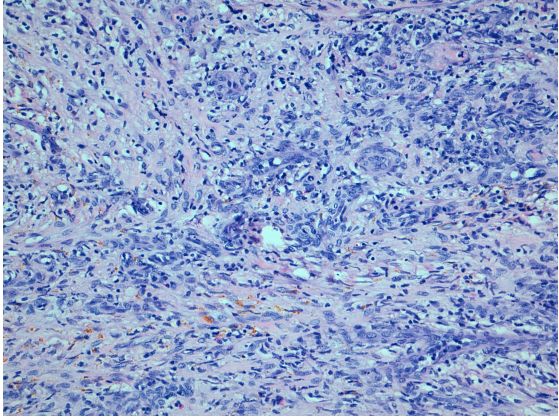
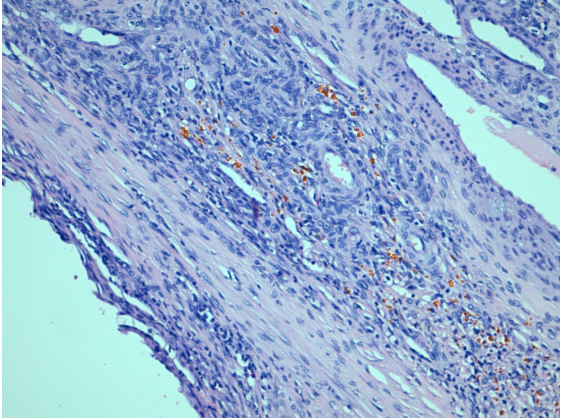
	CONTROL	CÉLULAS
1 día		
1sem		
1mes		
2mes		

Figura 30. Comparación del patrón inflamatorio agudo entre casos tratados y no tratados con células troncales mesenquimales. Se observa cómo en los casos tratados existe un infiltrado de predominio polimorfonuclear que disminuye notablemente a partir del primer mes de seguimiento en comparación con los controles. A los dos meses de seguimiento se observa una neoformación de vasos acompañada de la desaparición de la celularidad inflamatoria aguda. En los controles no tratados esta neoformación es menor y se observan todavía fenómenos inflamatorios agudos. Hematoxilina eosina (diferentes aumentos).

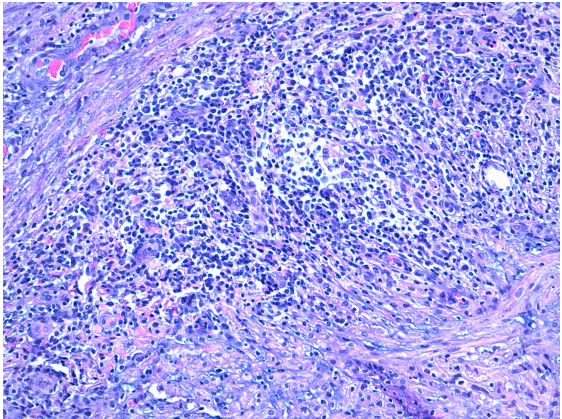
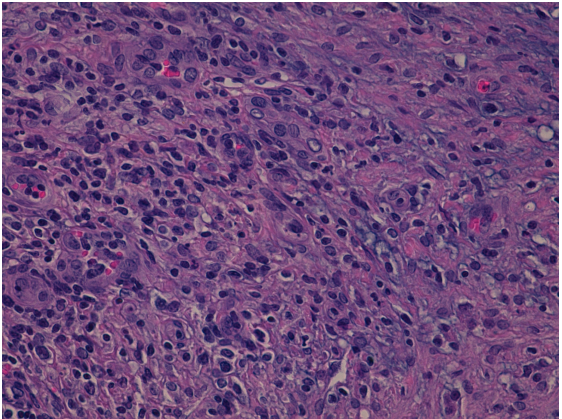
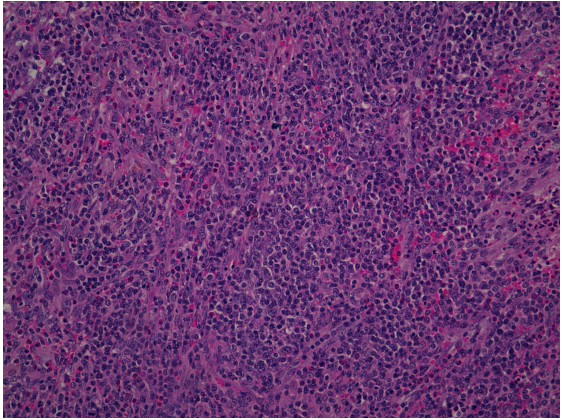
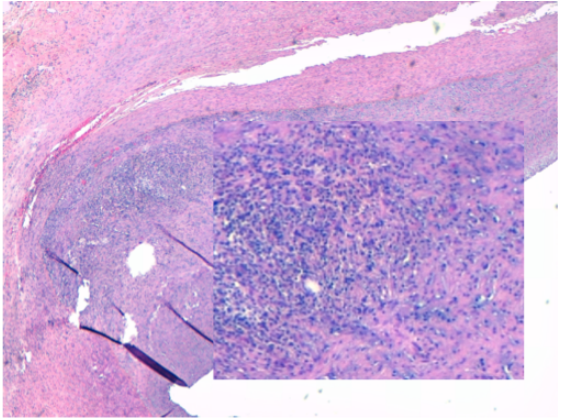
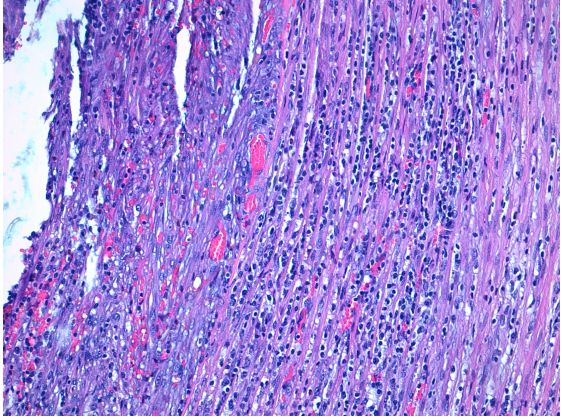
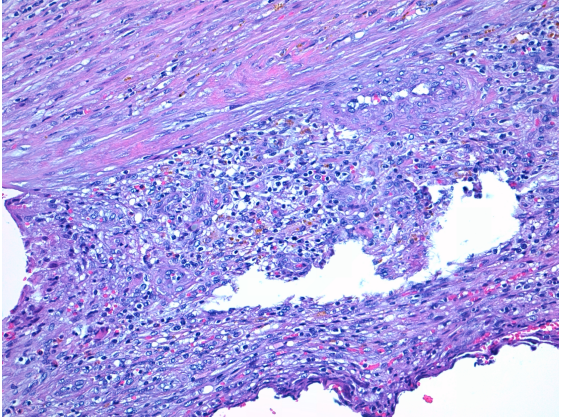
	CONTROL	CÉLULAS
1mes		
2mes		
3mes		

Figura 31. Comparación del proceso de inflamación crónica entre casos tratados con células troncales mesenquimales y controles. La celularidad inflamatoria mononuclear linfóide aparece más temprano y con más intensidad en los casos que en los controles. Se observa que en el seguimiento a un mes la mayor parte de las células de los controles son polimorfonucleares,

mientras que en los casos predomina una celularidad linfoide. A medida que aumenta el periodo de seguimiento disminuye el proceso inflamatorio en los animales tratados con células mientras que en los controles el infiltrado inflamatorio crónico aumenta significativamente. Hematoxilina eosina x20.

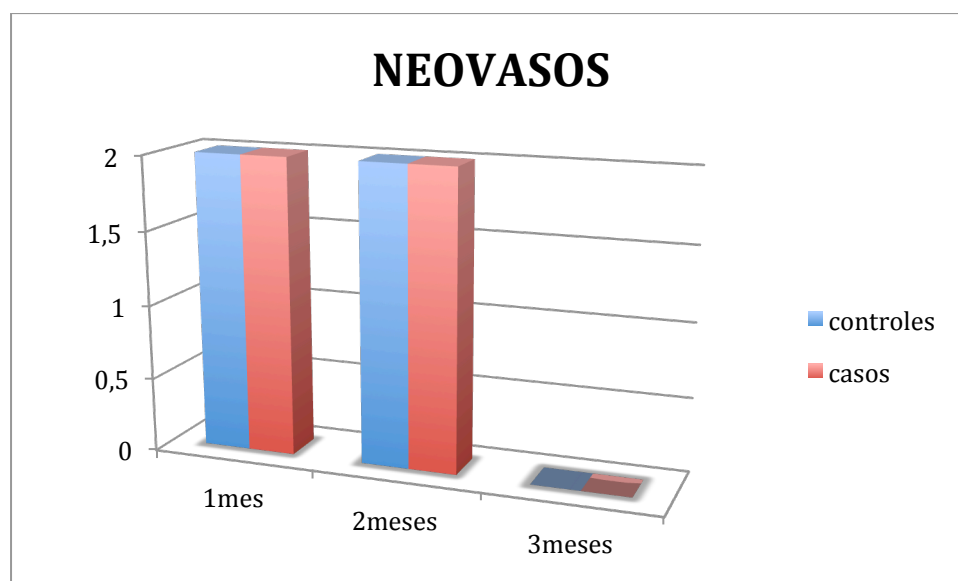
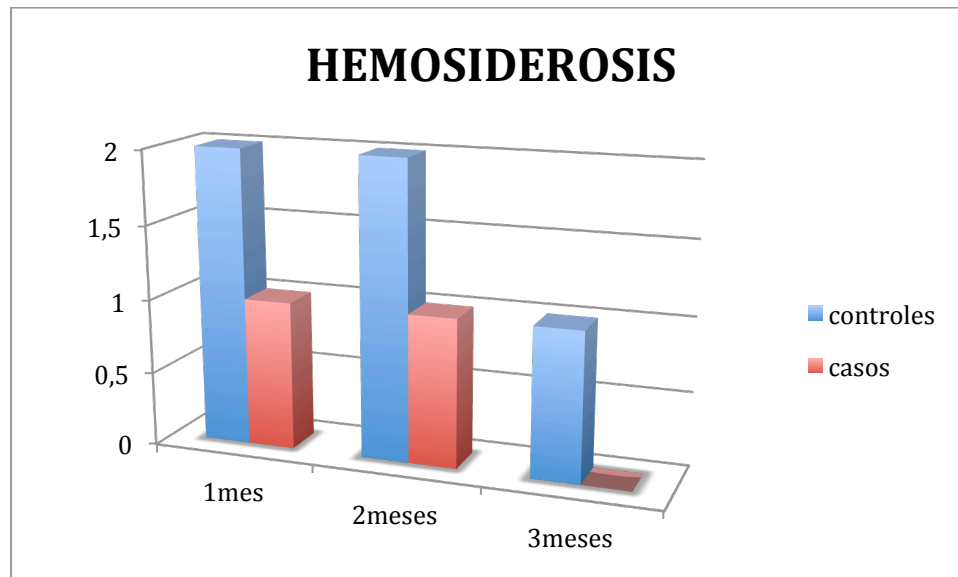


Figura 32. Gráfico que representa la presencia de Hemosiderosis (reacción a cuerpo extraño) y la neovascularización del saco aneurismático.
Hemosiderosis o reacción a cuerpo extraño: presencia de células gigantes multinucleadas con formación de granulomas. (1=<25%; 2=25-75%; 3=>75%).

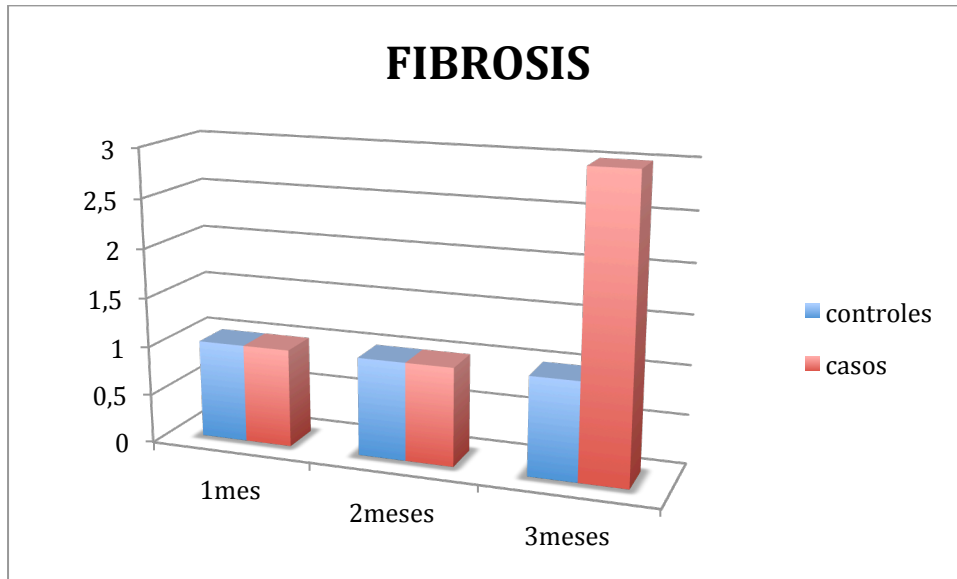


Figura 33. Gráfico donde se aprecia la evolución hacia una mayor fibrosis del saco aneurismático tratado con células troncales mesenquimales. Porcentaje de tejido fibrótico (1= $\leq 25\%$; 2= $25-75\%$; 3= $\geq 75\%$).

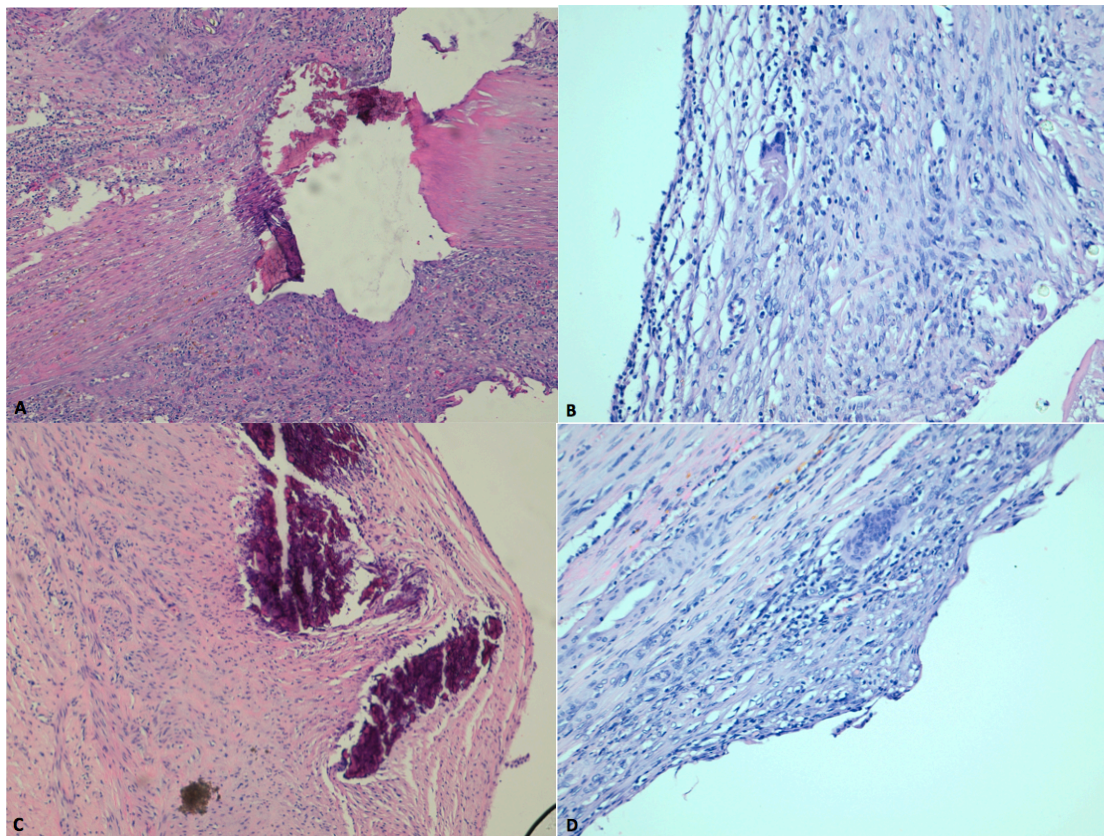


Figura 34. Hematoxilina eosina 40x-100x. Presencia de calcio en los controles no tratados con células troncales en dos y tres meses de seguimiento (A y C) que no aparece en los casos tratados en esos mismos periodos de tiempo (B y D).

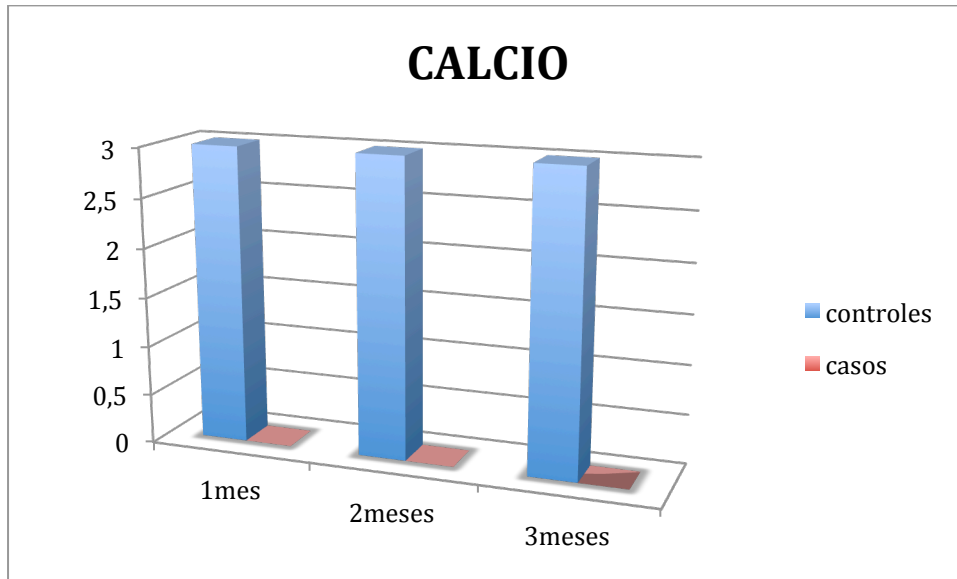


Figura 35. Gráfico donde se aprecia la presencia de calcio como indicador inflamatorio en los controles, que no aparece en los casos tratados con células troncales.

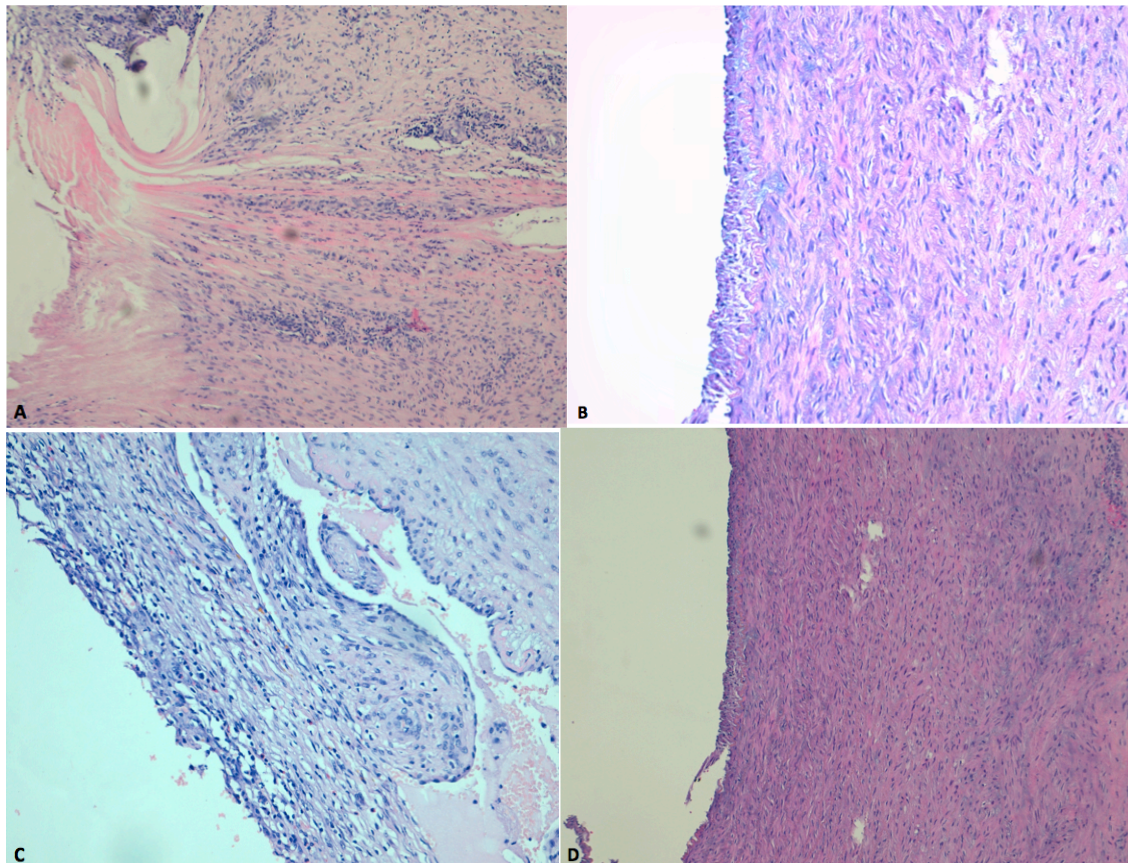


Figura 36. Control sin células a los dos (A) y tres (C) meses de seguimiento: no se aprecia la existencia de lámina elástica interna, que sí puede verse en los casos tratados con células troncales a los dos meses (B) y a los tres meses de seguimiento (D). Hematoxilina eosina 40x.

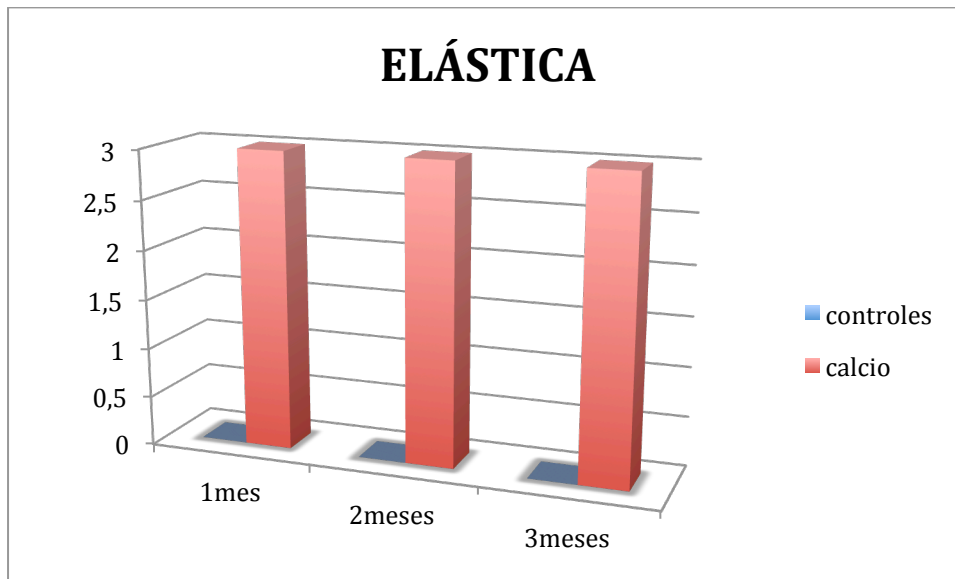


Figura 37. Gráfico donde se aprecia la presencia de lámina elástica interna sólo en los casos tratados con células madre y no en los controles.

2.3 Localización de las células troncales.

Encontramos células masculinas en los cortes histológicos desparafinados procedentes todos los animales tratados hasta los 3 meses (figs. 33-37). Inicialmente aparecen las células dispersas por el saco aneurismático y con la evolución del aneurisma a lo largo del tiempo se van agrupando en regiones específicas. Consideramos importante comentar que debido al grosor de los cortes sobre los que se realizó la técnica (5µm), no todos los cromosomas están en el mismo campo de visión y ha sido necesario ajustar continuamente el microenfoque del microscopio. También encontramos otra dificultad: el proceso de desparafinado de las muestras afecta ostensiblemente a la calidad de los cromosomas, lo cual dificulta la puesta a punto de las condiciones de la técnica FISH, un dato a tener en cuenta en futuros estudios.

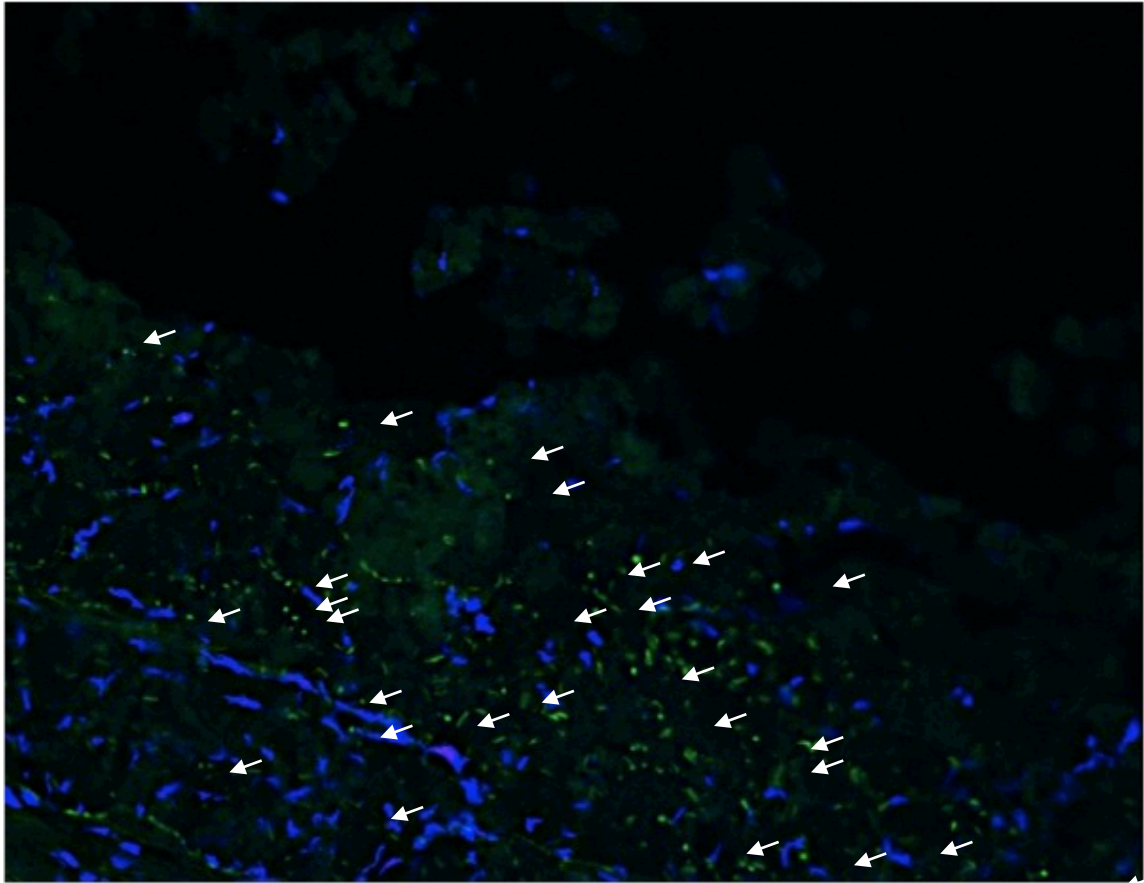


Figura 38. FISH en 24h de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

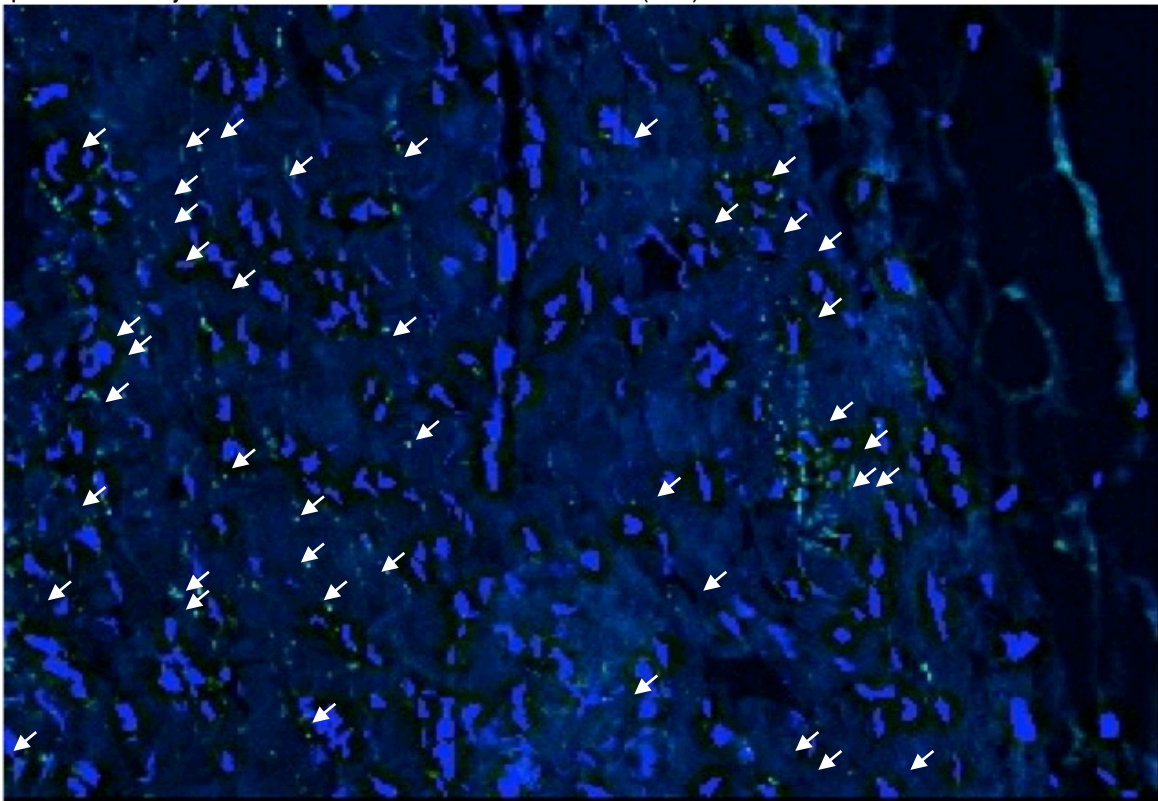


Figura 39. FISH en una semana de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

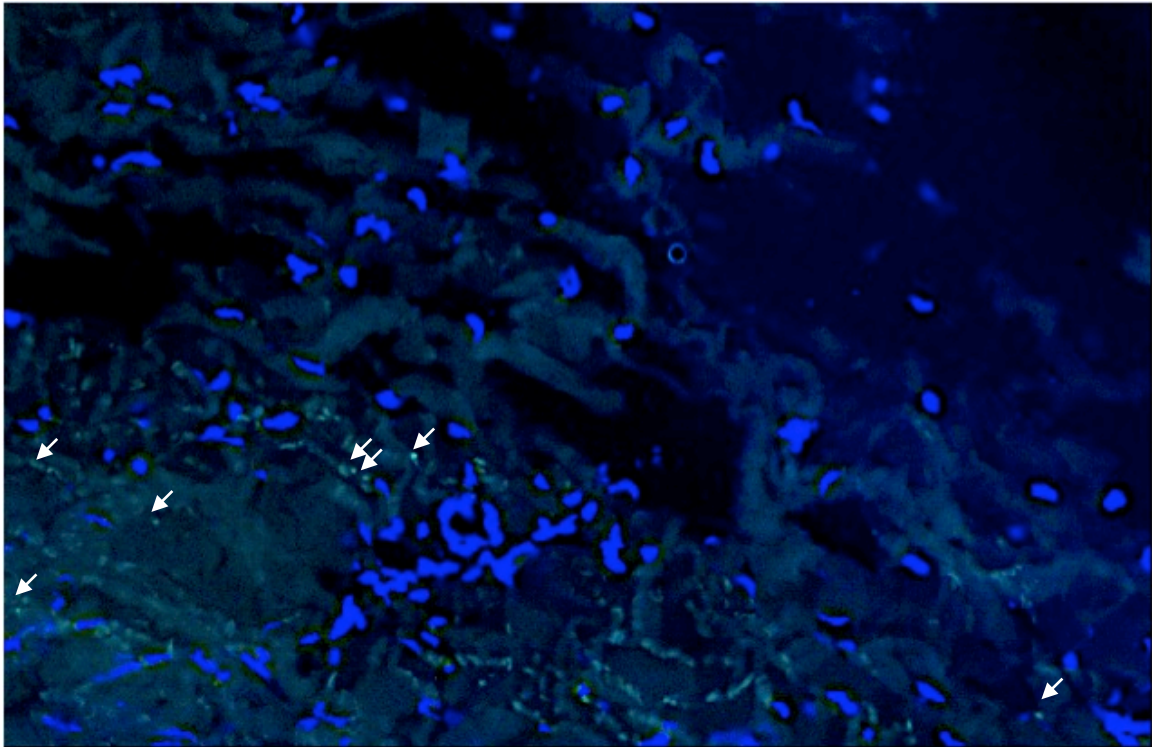


Figura 40. FISH en un mes de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

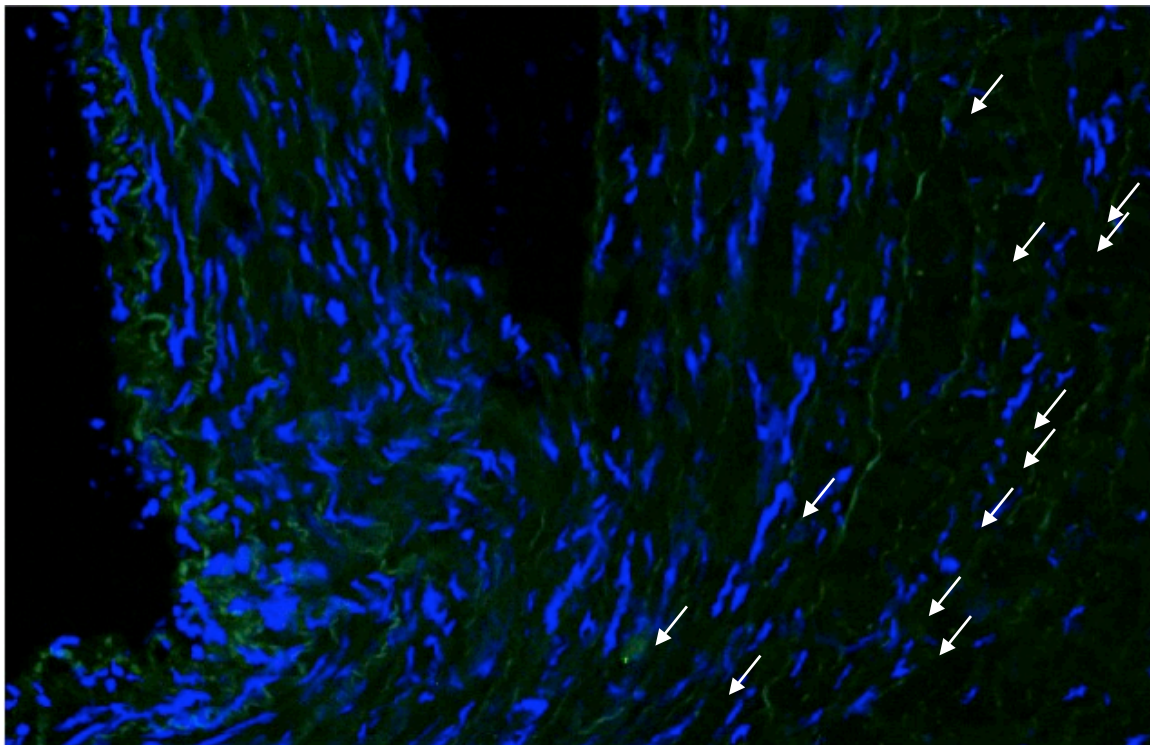


Figura 41. FISH en dos meses de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

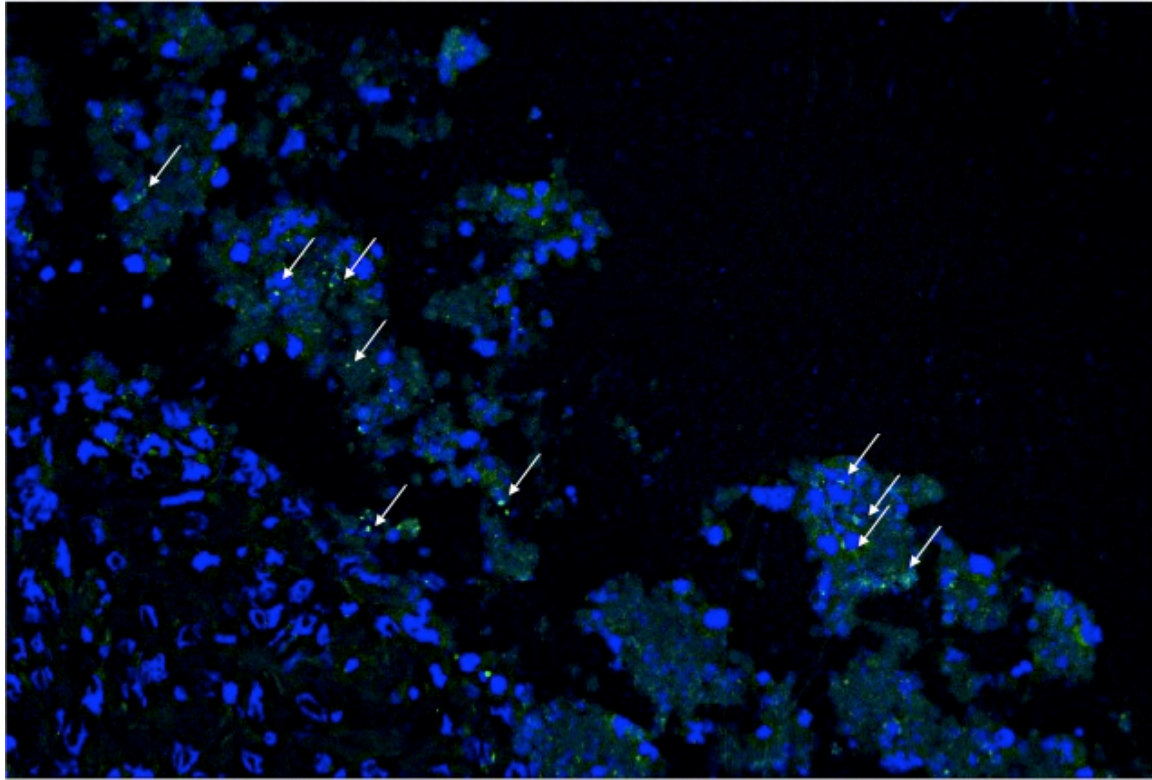


Figura 42. FISH en tres meses de seguimiento con FITC para el cromosoma Y (verde) y DAPI (azul) para el marcaje de los núcleos. Inmunofluorescencia (40x).

DISCUSIÓN

1. Modelo experimental.

Se ha puesto a punto un modelo de experimentación animal que sirve para estudiar el comportamiento de los dispositivos endovasculares y que hemos tenido la ocasión de publicar¹³². Se trata de un modelo fácilmente reproducible que no está exento de limitaciones, como todos los modelos, pero que permite de una manera relativamente sencilla la creación de un aneurisma artificial y su tratamiento en un solo tiempo quirúrgico. La mayoría de los modelos de aneurismas descritos en la literatura científica utilizan un parche de vena para crear la dilatación focal de la pared, pero en nuestro caso hemos evitado esta técnica por dos razones: evitar la complejidad quirúrgica en tiempo y número de las intervenciones a los animales y limitar la posibilidad de roturas y perforaciones descritas en modelos hechos con vena. En aquellos modelos que usan vena, el tratamiento a estudio se suele diferir, para dejar que se “arterialice” esta pared. Nosotros queríamos evitar un segundo tiempo quirúrgico para minimizar el problema de acceso arterial y además controlar el tamaño de los aneurismas, y diseñarlos de forma acorde al tamaño de los dispositivos (Wallgraft®) que teníamos. Asumimos también que la inflamación que se produce en el seno del parche de material protésico es mayor que si lo que se sutura a la arteria es un material biológico autólogo como la pared de una vena. Esto favorece uno de los aspectos principales que queríamos estudiar con nuestro modelo: la inflamación que se genera en el proceso de formación de un aneurisma. Entendemos que no se puede comparar el proceso inflamatorio que se produce en respuesta a esta agresión quirúrgica con la inflamación y degeneración de la pared arterial que se produce en los aneurismas de aorta, pero pensamos que es una buena aproximación. Por último, y no menos importante, el sufrimiento del animal es menor si la intervención se acorta al máximo y no le añadimos morbilidad al extraer una vena de gran tamaño de otro lugar para suturarla a la aorta abdominal.

Uno de los problemas que se planteó inicialmente era el uso de prótesis endoluminales adaptadas al tamaño humano adulto. Es muy difícil evitar el daño

de las estructuras anatómicas de un animal relativamente pequeño de 25kg para su implante. Con el modelo diseñado se minimiza ese daño, ya que utilizamos una vía de acceso alternativa al abordaje femoral convencional que sin ninguna duda provocaría lesiones importantes en la vascularización de las patas traseras del animal.

Durante el desarrollo del modelo experimental nos hemos encontrado varias dificultades que hemos podido solventar o incluso sacarles rendimiento. La más importante ha sido la alta mortalidad (un caso en la primera fase y cuatro en la segunda) siempre debida a la salida de material de fibrina del saco aneurismático o a la hipercoagulabilidad propia de estos animales. Estos casos no contemplados en el diseño nos han servido para estudiar los aneurismas en el postoperatorio inmediato. Posteriormente contrarrestamos la hipercoagulabilidad mediante heparina de bajo peso molecular a altas dosis. Si analizamos en profundidad las causas que han provocado estos problemas encontramos que los tamaños de las endoprótesis utilizadas no siempre fueron exactamente los precisos en cada caso. Para este estudio hemos utilizado prótesis retiradas del mercado por estar caducadas para la clínica o sobrantes de stocks de la compañía para uso humano. Creemos que el riesgo de fuga de la fibrina del saco podría eliminarse completamente utilizando prótesis diseñadas específicamente para este fin. Otra opción podría haber sido usar otro medio de transporte para las células como podría ser el suero fisiológico, pero no hemos explorado esta posibilidad por el riesgo de perder las células en el momento de su colocación. Además, la asociación con Tissucol Duo® ha sido probada en múltiples trabajos por nuestro grupo de investigación en otras patologías con excelentes resultados de supervivencia celular.

Otro aspecto que nos interesaba valorar con este modelo era el conocer qué ocurría con las prótesis con el aumento de tamaño de la aorta debido al rápido crecimiento de estos animales, que triplican su peso en menos de tres meses. Pensábamos que este hecho podía ser positivo para nuestra investigación, al producirse cambios de tamaño en la aorta que modificaran la posición de la

endoprótesis y sus zonas de anclaje que pudiéramos identificar en la CT. No hemos encontrado esos cambios debido probablemente a que este tipo de endoprótesis autoexpandible se ha amoldado al crecimiento rápido de la aorta, sin que su acortamiento haya propiciado la aparición de fugas. Estos resultados nos han llevado a plantear el uso de otros modelos de endoprótesis para futuras investigaciones y prolongar el tiempo de seguimiento, puesto que si la prótesis se acortara por debajo de la longitud del aneurisma podríamos ver definitivamente cómo se comporta el tejido que hemos implantado en su interior.

2. Supervivencia Celular

Se ha demostrado la supervivencia de células madre de origen mesenquimal en el interior de un saco aneurismático tratado mediante técnicas endovasculares tres semanas después de su introducción. Esto corrobora la hipótesis de la primera fase de este estudio. Una vez asegurada esta viabilidad celular en un plazo intermedio de tiempo se planteó una segunda fase, más compleja y más larga, para valorar los efectos de estas células y comprobar su supervivencia a mayor plazo.

Durante esta segunda fase se ha constatado la presencia de células troncales mesenquimales o descendientes de éstas tres meses después de su implante en el saco aneurismático mediante la detección del cromosoma Y. Se decidió cambiar la estrategia de detección porque la GFP modifica la evolución de los parámetros inflamatorios y podría alterar los resultados histológicos¹³⁵.

Se eligieron células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASC, Adipose Stem Cells) para este estudio porque han demostrado poseer importantes propiedades inmunológicas, antiinflamatorias y regenerativas. Todas estas características las hacen ideales para el objetivo de nuestro estudio. Se han publicado estudios que confirman el importante papel que tiene la inflamación en la fisiopatología de la arteria aneurismática. Parece ser que esta respuesta inflamatoria destruye las paredes de la arteria, desde el endotelio

hasta la túnica media¹³⁶. Pensamos que podría modularse esta respuesta inflamatoria mediante células troncales que liberen in situ sustancias inmunomoduladoras. Nuestra intención no es revertir el proceso de formación de los aneurismas pero sí controlarlo tras el tratamiento endovascular, para mejorar los resultados a largo plazo y aumentar la supervivencia.

Los estudios realizados por nuestro grupo en otras patologías han puesto de manifiesto que la asociación de las células troncales con Tissucol Duo (adhesivo a base de fibrina utilizado habitualmente en procesos quirúrgicos) que no interfiere en los mecanismos de acción de estas células. Nuestro grupo la usa en todos los ensayos clínicos en curso en este momento, y además esta asociación ya ha sido aprobada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS)¹³⁷.

3. Efectos de las células troncales mesenquimales en el saco aneurismático y posible aplicación clínica.

Los aneurismas de aorta suelen tener un origen arterioesclerótico. Hoy día se prefiere hablar de origen inespecífico, ya que no está claro el momento en que el daño arterioesclerótico de la pared arterial origina una progresión de la placa hacia la obstrucción de la luz o por el contrario desencadena la degeneración de la túnica media y la capa elástica provocando una dilatación del vaso y por lo tanto un aneurisma. Sabemos que la arterioesclerosis es en el fondo una reacción inflamatoria que se produce en los vasos sanguíneos y que acaba por destruir su pared¹³⁸.

Como ya se ha expuesto, actualmente existen dos posibles tratamientos de los aneurismas de aorta abdominal: la cirugía abierta convencional en la que se reseca dicho aneurisma y se sustituye por una prótesis¹³⁹ o la colocación de una endoprótesis que recubre la aorta desde dentro reconduciendo el flujo de sangre a su través y evitando con ello el crecimiento y el riesgo de rotura del aneurisma¹⁴⁰.

Está bien establecida la menor morbilidad periprocedimiento del tratamiento endovascular, que no necesita una agresión quirúrgica tan importante como la cirugía convencional ni un clampaje aórtico, y conlleva una menor estancia hospitalaria y una mayor aceptación por parte del enfermo¹⁴¹.

Esta ventaja del tratamiento endovascular parece ir diluyéndose a lo largo del tiempo y estos pacientes tienen una mayor tasa de reingresos para nuevos tratamientos complementarios por la aparición de fugas. Llamamos fuga a la repermeabilización de un saco aneurismático, es decir, a la entrada de un flujo directo de sangre que condiciona un aumento de presión en el saco y por tanto un nuevo riesgo de rotura del aneurisma. La aparición de estas fugas condiciona la necesidad de realizarse pruebas de imagen periódicas para detectarlas y tratarlas a tiempo (muchas veces también mediante técnicas endovasculares).

Hoy día se está estudiando qué tipo de pacientes y qué tipo de aneurismas se benefician más de cada uno de los tratamientos disponibles, para poder ofrecer un tratamiento óptimo (incluyendo el tratamiento no quirúrgico) a cada paciente concreto^{142,143}.

Uno de los inconvenientes que tiene el tratamiento endovascular frente a la cirugía convencional es que no se puede ofrecer a todos los pacientes. Se trata de pacientes con aneurismas que tienen ciertas peculiaridades anatómicas como son los cuellos cortos o angulados, o problemas para hacer llegar la endoprótesis al lugar deseado por patología de las arterias a través de las que deben introducirse estos dispositivos^{144,145,146}.

Actualmente hay muchas líneas de investigación activas para mejorar el rendimiento del tratamiento endovascular. Una de esas líneas de investigación ha sido el rellenar los aneurismas una vez excluidos mediante una endoprótesis de diversas sustancias para estabilizar de alguna manera el saco aneurismático, prevenir la aparición de fugas y evitar las complicaciones derivadas de la llamada remodelación del saco aneurismático a lo largo del tiempo¹⁴⁷. La

remodelación del saco es el cambio de forma y tamaño del saco aneurismático tratado, que en ocasiones puede condicionar cambios en la posición de la prótesis o incluso daños estructurales que provocan la repermeabilización del aneurisma con el consiguiente riesgo de crecimiento y rotura. Se han publicado recientemente trabajos que relacionan el tamaño y forma del trombo de los aneurismas con el pronóstico de los mismos antes de ser tratados, de forma que es posible que el papel del trombo mural sea más importante de lo que en principio se creía, también en el caso de los aneurisma excluidos mediante prótesis endovasculares¹⁴⁸¹⁴⁹.

Siguiendo esta línea de rellenar los aneurismas y los avances que los últimos años se están produciendo en el conocimiento de la biología de las células madre, es muy interesante pensar en asociar ambas ideas.

Nos ha llamado la atención a la palpación la consistencia del saco aneurismático tratado con células en comparación con el no tratado, incluso en un mismo animal. Subjetivamente parece que el aneurisma tratado es más duro, mientras que el no tratado tiene una consistencia más elástica. Podemos explicar este hecho aislado como un defecto de tratamiento en uno de los sacos o la existencia no percibida de algún tipo de fuga o, por qué no en un efecto del tratamiento con células. No teníamos previsto encontrar este hecho y en el futuro diseñaremos un trabajo adecuado para encontrar diferencias significativas y algún sistema para cuantificar esta apreciación subjetiva para así comprobarla, puesto que podría ser una consecuencia directa de la mayor y mejor estabilización del saco aneurismático.

Aunque no hemos encontrado diferencias en los estudios macroscópicos (salvo la impresión subjetiva de la dureza del saco, que pensamos pueda deberse a una mayor estabilización histológica), ni en el CT ni en el eco-doppler sí encontramos diferencias llamativas en el estudio histológico. Posiblemente no encontramos grandes cambios macroscópicos por las limitaciones que tiene el modelo, como el que los aneurismas son más pequeños que los aneurismas

reales, que son artificiales y por tanto no tienen arterias colaterales ni los lugares de anclaje de la endoprótesis (cuellos) presentan patología alguna que impida un correcto sellado de los mismos. Tampoco el modelo de endoprótesis seleccionada es la idónea para estudiar con un CT, ya que al tener el esqueleto de acero se artefacta mucho la imagen que se obtiene con esta técnica, dificultando mucho el estudio del saco aneurismático.

El estudio histológico, principal variable a estudiar para los objetivos planteados sí resulta revelador. Las células troncales mesenquimales aparentan tener **efecto beneficioso sobre el saco aneurismático colaborando en la modulación de la respuesta inflamatoria**, acortando ésta y favoreciendo la regeneración de la pared arterial. Nos ha llamado mucho la atención **la aparición de una lámina elástica interna** en los casos tratados y con mayores tiempos de seguimiento, hecho que **sugiere la capacidad regenerativa** de las células inyectadas en este nicho. Aunque asumimos que el número de animales de cada grupo no nos permite afirmar con rotundidad estadística estos resultados, consideramos notable la consistencia de los resultados encontrados en cada grupo.

Una de las características descritas en la literatura de las células troncales mesenquimales es el estímulo para la neoformación de vasos sanguíneos. En nuestro estudio no se ha producido este hecho con relevancia, posiblemente porque el entorno de señales que se producen en un saco aneurismático no transmiten esta necesidad como puede ocurrir por ejemplo en la isquemia de miembros inferiores. Esta será una línea de investigación futura, ya que consideramos que si descubrimos las señales que *in vivo* provocan o inhiben esta neoangiogénesis podremos implementar algunos tratamientos.

Otro de los aspectos más relevantes ha sido saber que las células insertadas son capaces de perpetuarse en este nicho tan específico y por lo tanto parece sensato pensar que su funcionalidad y capacidad de división también. En nuestro conocimiento esta es la primera vez que se usa una administración

intravascular pero a la vez localizada gracias a un dispositivo intraluminal de células troncales en un ser vivo. Este descubrimiento abre las puertas a muchas consideraciones que nos parecen muy interesantes para futuros estudios.

Hoy en día parece cada vez más claro el papel de las células progenitoras endoteliales en la angiogénesis y las mesenquimales en los procesos de reparación tisular e inflamación. Muchos ensayos clínicos buscan aprovechar las propiedades reparadoras, inmunomoduladoras y proangiogénicas que han demostrado tener estas células, tanto a nivel miocárdico como arterial periférico por centrarnos en la patología cardiovascular. A pesar de todos estos estudios aún desconocemos la forma óptima de aplicación de las células. Nuestro estudio demuestra que es posible la administración local, que favorece que el número de células que llegan al punto exacto donde su colaboración podría mejorar las técnicas endovasculares sea el máximo. Enlaza perfectamente con la creencia cada vez más extendida gracias a importantes estudios internacionales y práctica clínica habitual que las prótesis endovasculares y stents medicados son más efectivos en determinados casos que los no medicados y abre la posibilidad de medicar estos dispositivos con células madre obtenidas previamente del propio paciente o incluso, por qué no, usando células troncales mesenquimales de forma alogénica.

Consideramos muy interesante que el uso de células mesenquimales alogénicas sin tratamiento inmunosupresor durante el desarrollo del estudio no ha producido ningún efecto adverso, aunque no es novedoso si es importante resaltarlo para la futura aplicación de células mesenquimales¹⁵⁰¹⁵¹. Al menos las células alogénicas derivadas del tejido adiposo, en nuestra experiencia, podrían llegar a utilizarse en una futura práctica clínica facilitando el proceso, disminuyendo la morbilidad para los pacientes y ahorrando tiempo que puede ser crucial en el tratamiento de algunos aneurismas de aorta abdominal.

Creemos que el modelo planteado en este trabajo no difiere en exceso de un modelo de patología obstructiva, en el que colocáramos las células madre dentro

de la propia pared arterial enferma. Centrándonos en el caso de los aneurismas, a la vista de nuestros resultados pensamos que las células troncales mesenquimales podrían actuar dentro del saco aneurismático de varias formas:

- Rellenando el saco aneurismático y sustituyendo al trombo mural por un tejido conectivo fibroso, con algunos datos incluso de regeneración de la pared vascular.
- Actuando de forma paracrina como estabilizadores del proceso de destrucción de la túnica media que sucede en estos casos.
- Contribuyendo a mejorar el equilibrio inflamación/reparación en el seno de las capas de la pared arterial.
- Aunque no hemos estudiado la diferenciación celular *in situ*, no descartamos que alguna de las células inyectadas se hayan diferenciado a células de los tejidos dañados (SMC), ya que consigue regenerar de alguna manera la estructura de una arteria normal (elástica interna, disposición celular circunferencial).

Cuando se trata un aneurisma de forma endovascular lo único que se pretende es disminuir incluso eliminar el posible el riesgo de rotura. Sucede de igual forma con los aneurismas de aorta que con los aneurismas periféricos, los viscerales o incluso los cerebrales, lo único que cambia es la forma de excluir al aneurisma de la circulación arterial y eliminar la acción hemodinámica sobre ellos. Cuando el tratamiento es abierto-convencional, el aneurisma se reseca, sustituyéndolo o no por una prótesis y se elimina el tejido enfermo. Con este tratamiento celular co-adyuvante del tratamiento endovascular pretendemos tratar al problema de raíz, que es la degeneración de las capas de la arteria enferma, por supuesto con el aneurisma excluido de la circulación y reducido al máximo el riesgo de rotura.

Con este trabajo hemos demostrado que las células mesenquimales inyectadas encuentran en ese saco aneurismático excluido un nicho adecuado para su

supervivencia. Ahora trataremos de valorar la acción y efectividad que les suponemos a las mismas, con nuevas hipótesis de trabajo.

4. Perspectivas de futuro.

En el seno de la Angiología y Cirugía Vascular el futuro más inmediato se espera confirme los resultados preliminares obtenidos por numerosos grupos en el campo de la isquemia crónica de extremidades y el papel co-adyuvante que puede tener la terapia celular en el tratamiento de esta patología, en virtud de su capacidad de promover y mejorar la neovascularización de los tejidos isquémicos y regular el proceso inflamatorio.

Este trabajo quiere aportar a esa línea una nueva posibilidad de vehiculizar las células madre, en el seno de prótesis endovasculares o mediante inyecciones de las mismas desde el interior del vaso en la zona más cercana a las obstrucciones o en el inicio de las mismas.

Además se añade una nueva hipótesis de trabajo en el campo de la cirugía vascular no abierta hasta la fecha, como es el de la patología aneurismática y las posibilidades que les suponemos a estas células en esta situación.

Se abre la posibilidad de diseñar dispositivos que permitan la colocación in situ de diferentes tipos celulares que puedan facilitar esta nueva línea de tratamiento que asocie los beneficios de las técnicas endovasculares con el potencial de las terapias biológicas de la medicina regenerativa e incluso se plantea la posibilidad de usar células alogénicas para nuestros pacientes, con las ventajas que esto supondría para ellos, simplificando mucho el procedimiento.

Estos resultados nos hacen ser muy optimistas de cara al diseño de futuros experimentos, en los que esperamos demostrar un efecto beneficioso funcional del tratamiento celular, mediante estudios biomecánicos, y de imagen a mayor largo plazo, que nos permitan valorar *in vivo* la remodelación del saco y su

estabilización mejor con células madre, así como analizar bioquímicamente su capacidad de síntesis de moduladores con actividad paracrina.

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental de aneurisma de aorta desarrollado sobre porcino se ha mostrado factible, reproducible y demuestra su utilidad para estudiar el comportamiento *in vivo* de los dispositivos endoluminales.
2. Las endoprótesis autoexpandibles con esqueleto de acero sobredimensionadas se adaptan al crecimiento rápido de las arterias en este modelo.
3. Las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo se perpetúan vivas al menos tres meses en el interior del saco de un aneurisma excluido de la circulación mediante una endoprótesis recubierta.
4. El saco aneurismático tratado con células troncales mesenquimales se rellena de un tejido cicatricial que presenta mayor fibrosis que los controles.
5. Cuando se introducen células troncales en el saco aneurismático excluido se identifica una tendencia a que el proceso inflamatorio agudo dure menos y se cronifique antes, con una menor necrosis.
6. En nuestro modelo se produce la regeneración de la elástica interna sólo en los casos tratados con células troncales mesenquimales.
7. En nuestro modelo el uso de células troncales inhibe el acúmulo de depósitos de calcio en el saco aneurismático.

LIMITACIONES

Las limitaciones de este estudio son:

1. Limitaciones propias del modelo de experimentación: se trata de un parche protésico, no de un AAA verdadero, que está hecho sobre arterias sanas y de un tamaño y edad diferentes a la clínica habitual.
2. Tiempo cortos de seguimiento: Los AAA son una patología crónica, mientras que este modelo se desarrolla en un tiempo limitado.
3. La endoprótesis utilizada no está diseñada para este modelo, ni por sus tamaños ni por sus materiales de fabricación, que impiden su inclusión en los estudios histológicos y artefactan las imágenes del CT.
4. Reducido Tamaño muestral que no ha permitido un análisis estadístico: desde nuestro punto de vista ésta es la mayor limitación.

Hemos tenido problemas con las instalaciones de Cirugía Experimental y animalarios, en obras durante más de 6 meses. Los resultados homogéneos que obtuvimos con los seguimientos a corto plazo nos animó a reducir la n de cada grupo a cambio de analizar tiempos mayores, siempre condicionados por las limitaciones económicas de la estabulación en otro centro. La consistencia de los resultados en los animales tratados con células, aun siendo pocos los animales estudiados nos hizo replantarnos la necesidad de utilizar más animales siguiendo las buenas prácticas de experimentación animal, sin olvidar el alto coste por animal y procedimiento. Hemos analizado con el Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz los resultados histológicos sin que se haya podido realizar el correspondiente estudio estadístico debido a este reducido tamaño muestral, que sólo nos ha permitido hacer una descripción de los resultados. Estos resultados sí nos han permitido calcular estadísticamente el tamaño muestral adecuado para obtener resultados significativos que resulta ser de más de 100 casos ($n=8$ por tiempo y grupo), algo complicado también desde el punto de vista de la legislación vigente sobre el sufrimiento de los animales.

BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Cronenwett JL, Johnston KW. Rutherford's Vascular Surgery. 7th ed. Saunders, 2010. Pgs 53-67.
- ² D.W. Fawcett. Tratado de Histología. 12^a ed. Interamericana Mc Graw-Hill 1995. Pgs 411-27.
- ³ www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index2.html
- ⁴ Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J 3rd. Factors of risk in the development of coronary heart disease six year follow-up experience: the Framingham study. *Ann Intern Med* 1961;55:33
- ⁵ Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP 3rd, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N Engl J Med* 1998; 338:1650-6.
- ⁶ McGill Jr HC, McMahan CA, Gidding SS. Preventing heart disease in the 21st century: implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study. *Circulation* 2008;117:1216-27.
- ⁷ Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyörälä K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H; **Scandinavian Simvastatin Survival Study** Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-9.
- ⁸ Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- ⁹ Benditt EP, Benditt JM. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:1753-6.
- ¹⁰ Flavahan NA. Atherosclerosis or lipoprotein induced endothelial dysfunction: potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* 1992;85:1927.
- ¹¹ Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488.
- ¹² Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev Physiol* 1995;57:791.
- ¹³ Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, Borén J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002;417;750-4.
- ¹⁴ Quehenberger O. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Molecular mechanisms regulating monocyte recruitment in atherosclerosis. *J Lipid Res* 2005;46:1582-90.
- ¹⁵ Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, MacFarlane LA, Mallen-St Clair J, Shi GP. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* 2007;13:719-24.
- ¹⁶ Johnson KA, Polewski M, Terkeltaub RA. Transglutaminase 2 is central to induction of the arterial calcification program by smooth muscle cells. *Circ Res* 2008;102:529-37.
- ¹⁷ Grundy SM, Pasternak R, Greenland P, Smith S Jr, Fuster V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation* 1999;100:1481.
- ¹⁸ Barter P. The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *Eur Heart J Suppl* 2005;7:F4.
- ¹⁹ Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* 2003;108:1729-34.
- ²⁰ Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403-9.
- ²¹ Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 2001;7:382-3.
- ²² Shantsila E, Timothy Watson T, Lip GYH. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Surg* 2007;49:741.
- ²³ Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1.

- ²⁴ Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593.
- ²⁵ Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391.
- ²⁶ Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Mische E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220.
- ²⁷ Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003;107:3059.
- ²⁸ Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, Libby P, Raichlen JS, Ballantyne CM, Davignon J, Erbel R, Fruchart JC, Tardif JC, Schoenhagen P, Crowe T, Cain V, Wolski K, Goormastic M, Tuzcu EM; ASTEROID Investigators. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006;295:1556-65.
- ²⁹ Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R, Joyal SV, Hill KA, Pfeffer MA, Skene AM; Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004;350:1495-504.
- ³⁰ DePalma RG, Hubay CA, Insull W Jr, Robinson AV, Hartman PH. Progression and regression of experimental atherosclerosis. *Surg Gynecol Obstet* 1970;131:633-47.
- ³¹ Dobrin PB, Littooy FN, Endean ED. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. *Surgery* 1989;105:393-400.
- ³² Kohler TR, Jawien A. Flow affects development of intimal hyperplasia after arterial injury in rats. *Arterioscler Thromb* 1992;12:963-71.
- ³³ Reis GJ, Kuntz RE, Silverman DI, Pasternak RC. Effects of serum lipid levels on restenosis after coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1991;68:1431-5.
- ³⁴ Carrozza JPJ, Kuntz RE, Fishman RF, Baim DS. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1993;118:344-9.
- ³⁵ Law MM, Gelabert HA, Moore WS, Hajjar GE, Colburn MD, Petrik PV, Quiñones-Baldrich WJ. Cigarette smoking increases the development of intimal hyperplasia after vascular injury. *J Vasc Surg* 1996;23:401-9.
- ³⁶ Sahni R, Maniet AR, Voci G, Banka VS. Prevention of restenosis by lovastatin after successful angioplasty. *Am Heart J* 1991;121:1600-8.
- ³⁷ Guidoin R, Chakfé N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M, Gosselin C. ePTFE arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials* 1993;14:678-93.
- ³⁸ Golden MA, Au YPT, Kenagy RD, Clowes AW. Growth factor gene expression by intimal cells in healing polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg* 1990;11:580-5.
- ³⁹ Cordero JA, Quist M, LoGerfo FW. VEGF expression in healing PTFE vascular grafts. *J Vasc Res* 1996; 33(Suppl 1):44.
- ⁴⁰ Kohler TR, Kirkman TR, Kraiss LW, Zierler BK, Clowes AW. Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts. *Circ Res* 1991;69:1557-65.
- ⁴¹ Lowe HC, Oesterle SN, Khachigan LM. Coronary in stent restenosis: current status and future strategies. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:183-93.
- ⁴² Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:267-74.
- ⁴³ Farb A, Kolodgie FD, Hwang JY, Burke AP, Tefera K, Weber DK, Wight TN, Virmani R. Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries. *Circulation* 2004;110:940-7.
- ⁴⁴ Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:193-202.
- ⁴⁵ Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, Virmani R. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1500-10.

- ⁴⁶ Mwipatayi BP, Thomas S, Wong J, Temple SE, Vijayan V, Jackson M, Burrows SA; Covered Versus Balloon Expandable Stent Trial (COBEST) Co-investigators. Covered Versus Balloon Expandable Stent Trial (COBEST) Co-investigators. A comparison of covered vs bare expandable stents for the treatment of aortoiliac occlusive disease. *J Vasc Surg* 2011;54(6):1561-70.
- ⁴⁷ Lindholt JS, Gottschalksen B, Johannesen N, Dueholm D, Ravn H, Christensen ED, Viddal B, Flørenes T, Pedersen G, Rasmussen M, Carstensen M, Grøndal N, Fasting H. The Scandinavian Propaten(®) trial 1-year patency of PTFE vascular prostheses with heparin-bonded luminal surfaces compared to ordinary pure PTFE vascular prostheses a randomised clinical controlled multi-centre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;41(5):668-73.
- ⁴⁸ Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 2003;93:783-90.
- ⁴⁹ Griesse DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 2003;108:2710-5.
- ⁵⁰ Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
- ⁵¹ Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006;98:697-704.
- ⁵² Chichester Aneurysm Screening Group; Viborg Aneurysm Screening Study; Western Australian Abdominal Aortic Aneurysm Program; Multicentre Aneurysm Screening Study. A comparative study of the prevalence of abdominal aortic aneurysms in the United Kingdom, Denmark, and Australia. *J Med Screen* 2001;8(1):46-50.
- ⁵³ Scott RA, Bridgewater SG, Ashton HA. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg* 2002 Mar;89(3):283-5.
- ⁵⁴ Tilson MD. Aortic aneurysms and atherosclerosis. *Circulation* 1992;85:378.
- ⁵⁵ Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, Greenhalgh RM, Powell JT; UK Small Aneurysm Trial Participants. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* 2004;110:16.
- ⁵⁶ Raux M, Cochennecc F, Becquemin JP. Statin therapy is associated with aneurysm sac regression after endovascular aortic repair. *J Vasc Surg* 2012;55:1587-92.
- ⁵⁷ Wassef M, Upchurch GR Jr, Kuivaniemi H, Thompson RW, Tilson MD 3rd. Challenges and opportunities in abdominal aortic aneurysm research. *J Vasc Surg*. 2007;45(1):192-8.
- ⁵⁸ Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Gordon IL, Chute EP, Littooy FN, Krupski WC, Bandyk D, Barone GW, Graham LM, Hye RJ, Reinke DB. Relationship of age, gender, race, and body size to infrarenal aortic diameter. The Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *J Vasc Surg* 1997;26:595.
- ⁵⁹ Ogata T, Shibamura H, Tromp G, Sinha M, Goddard KA, Sakalihasan N, Limet R, MacKean GL, Arthur C, Sueda T, Land S, Kuivaniemi H. Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2005;41:1036.
- ⁶⁰ Moñux G, Mateos PJ, Zamorano JJ, Serrano J. Genética, epigenética y proteómica de los aneurismas de aorta abdominal. *Angiología* 2012;64(3):119-25.
- ⁶¹ Xu C, Zarins CK, Glagov S. Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. *J Vasc Surg* 2001;33:91.
- ⁶² Abdul-Hussien H, Hanemaaijer R, Kleemann R, Verhaaren BF, van Bockel JH, Lindeman JH.. The pathophysiology of abdominal aortic aneurysm growth: corresponding and discordant inflammatory and proteolytic processes in abdominal aortic and popliteal artery aneurysms. *J Vasc Surg* 2010;51(6):1479-87.
- ⁶³ de Nigris F, Gallo L, Sica V, Napoli C. Glycooxidation of low-density lipoprotein promotes multiple apoptotic pathways and NFkappaB activation in human coronary cells. *Basic Res Cardiol*. 2006;101(2):101-8.
- ⁶⁴ Parry DJ, Al-Barjas HS, Chappell L, Rashid ST, Ariëns RA, Scott DJ. Markers of inflammation in men with small abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2010;52(1):145-51.

-
- ⁶⁵ Samson R. Can pharmacologic agents slow abdominal aortic aneurysm growth? *Sem Vasc Surg* 2012;25:25-8.
- ⁶⁶ Swedenborg J, Eriksson P. The intraluminal thrombus as a source of proteolytic activity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:133-8.
- ⁶⁷ Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost* 2007;98:427-33.
- ⁶⁸ Fillinger MF, Raghavan ML, Marra SP, Cronenwett JL, Kennedy FE. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *J Vasc Surg* 2002;36(3):589-97.
- ⁶⁹ Ailawadi G, Knipp BS, Lu G, Roelofs KJ, Ford JW, Hannawa KK, Bishop K, Thanaporn P, Henke PK, Stanley JC, Upchurch GR Jr. A nonintrinsic regional basis for increased infrarenal aortic MMP-9 expression and activity. *J Vasc Surg* 2003;37:1059.
- ⁷⁰ Dalman RL, Tedesco MM, Myers J, Taylor CA. AAA : disease: mechanism, stratification, and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:92.
- ⁷¹ McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228.
- ⁷² Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1625-33.
- ⁷³ Lorelli DR, Jean-Claude JM, Fox CJ, Clyne J, Cambria RA, Seabrook GR, Towne JB. Response of plasma matrix metalloproteinase-9 to conventional abdominal aortic aneurysm repair or endovascular exclusion: implications for endoleak. *J Vasc Surg* 2002;35:916.
- ⁷⁴ Lindholt JS, Shi GP. Chronic inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg* 2006;31:453.
- ⁷⁵ Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Holt PJ, van Keulen JW, Rantner B, Schlösser FJ, Setacci F, Ricco JB; European Society for Vascular Surgery. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;41 Suppl 1:S1-S58.
- ⁷⁶ Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG; EVAR trial participants. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364:843-8.
- ⁷⁷ Prinssen M, Verhoeven EL, Buth J, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, Buskens E, Grobbee DE, Blankensteijn JD; Dutch Randomized Endovascular Aneurysm Management (DREAM) Trial Group. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2004;351:1607-18.
- ⁷⁸ United Kingdom EVAR Trial Investigators, Greenhalgh RM, Brown LC, Powell JT, Thompson SG, Epstein D, Sculpher MJ. Endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 2010;362:1863-71.
- ⁷⁹ Schermerhorn ML, O'Malley AJ, Jhaveri A, Cotterill P, Pomposelli F, Landon BE. Endovascular vs. open repair of abdominal aortic aneurysms in the Medicare population. *N Engl J Med* 2008;358:464-74.
- ⁸⁰ De Bruin JL, Baas AF, Buth J, Prinssen M, Verhoeven EL, Cuypers PW, van Sambeek MR, Balm R, Grobbee DE, Blankensteijn JD; DREAM Study Group. Long-term outcome of open or endovascular repair of abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 2010;362:1881-9.
- ⁸¹ Voûte MT, Bastos Gonçalves FM, Hendriks JM, Metz R, van Sambeek MR, Muhs BE, Verhagen HJ Treatment of Post-implantation Aneurysm Growth by Laparoscopic Sac Fenestration: Long-term Results. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012 Jul;44(1):40-4.
- ⁸² Baum RA, Stavropoulos SW, Fairman RM. Endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14(9):1111-7.
- ⁸³ Kaladji A, Cardon A, Abouliatim I, Campillo-Gimenez B, Heautot JF, Verhoye JP. Preoperative predictive factors of aneurysmal regression using the reporting standards for endovascular aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2012;55(5):1287-95.
- ⁸⁴ Schanzer A, Greenberg RK, Hevelone N, Robinson WP, Eslami MH, Goldberg RJ, Messina L. Predictors of abdominal aortic aneurysm sac enlargement after endovascular repair. *Circulation* 2011;123(24):2848-55.

-
- ⁸⁵ Hackmann AE, Rubin BG, Sanchez LA, Geraghty PA, Thompson RW, Curci JA. A randomised, placebo-controlled trial of doxycycline after endoluminal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2008;48:519-26.
- ⁸⁶ Evans J, Powell JT, Schwalbe E, Loftus IM, Thompson MM. Simvastatin attenuates the activity of matrix metalloprotease-9 in aneurysmal aortic tissue. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;34:302-3.
- ⁸⁷ Bailey MA, Sohrabi S, Flood K, Griffin KJ, Rashid ST, Johnson AB, Baxter PD, Patel JV, Scott DJ. Calcium channel blockers enhance sac shrinkage after endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2012;55(6):1593-9.
- ⁸⁸ van der Steenhoven TJ, Bosman WM, Tersteeg C, Jacobs MJ, Moll FL, de Groot PG, Heyligers JM. Thrombogenicity of a new injectable biocompatible elastomer for aneurysm exclusion, compared to expanded polytetrafluoroethylene in a human ex vivo model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;43(6):675-80.
- ⁸⁹ Bosman WM, Vlot J, van der Steenhoven TJ, van den Berg O, Hamming JF, de Vries AC, Brom HL, Jacobs MJ. Aortic Customize: an in vivo feasibility study of a percutaneous technique for the repair of aortic aneurysms using injectable elastomer. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40(1):65-70.
- ⁹⁰ Krievins DK, Holden A, Savlovskis J, Calderas C, Donayre CE, Moll FL, Katzen B, Zarins CK. EVAR using the Nellix Sac-anchoring endoprosthesis: treatment of favourable and adverse anatomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;42(1):38-46.
- ⁹¹ Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
- ⁹² Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 2009;217: 282-98.
- ⁹³ Grinnemo KH, Sylvén C, Hovatta O, Dellgren G, Corbascio M. Immunogenicity of human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 2008;331:67-78.
- ⁹⁴ Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* 2008;100: 133-58.
- ⁹⁵ Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
- ⁹⁶ Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
- ⁹⁷ Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318:1917-20.
- ⁹⁸ Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-80.
- ⁹⁹ Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
- ¹⁰⁰ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-7.
- ¹⁰¹ Hiroshi M. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch (Abstract)*2009;76:56-66.
- ¹⁰² Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-28.
- ¹⁰³ Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007;25:818-27.
- ¹⁰⁴ De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44:1928-42.
- ¹⁰⁵ Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-84.
- ¹⁰⁶ Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *CircRes* 2007;100:1249-60.

- ¹⁰⁷ Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol* 2006;291:R880-4.
- ¹⁰⁸ Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004;110:349-55.
- ¹⁰⁹ Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006;17:279-90.
- ¹¹⁰ Reiser J, Zhang XY, Hemenway CS, Mondal D, Pradhan L, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5:1571-84.
- ¹¹¹ Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc* 2007; 39:3358-62.
- ¹¹² Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2007; 52:79-86.
- ¹¹³ Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, Benati D, Krampera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119: 1409-22.
- ¹¹⁴ Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006;119:2945-52.
- ¹¹⁵ Bacou F, el Andalousi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y, Nougès J. Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Increases Mass and Functional Capacity of Damaged Skeletal Muscle. *Cell Transplantation*, 2004 Vol. 13, pp. 103–11.
- ¹¹⁶ Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275(5302):964-7.
- ¹¹⁷ Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Wagner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5(4):434-8.
- ¹¹⁸ Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-42.
- ¹¹⁹ Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-coA reductase inhibitor simvastatin activates de protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6(9):1004-10.
- ¹²⁰ Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, Roy RR, Edgerton VR. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;157(4):571-7.
- ¹²¹ Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, Grego F, Vigili de Kreutzenberg S, Tiengo A, Agostini C, Avogaro A. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2140-6.
- ¹²² Li M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006;98(5):697-704.
- ¹²³ Sprengers RW, Lips DJ, Moll FL, Verhaar MC. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg* 2008;247:411-20.
- ¹²⁴ Sprengers RW, Moll FL, Teraa M, Verhaar MC; JUVENTAS Study Group. Rationale and design of the JUVENTAS trial for repeated intra-arterial infusion of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg* 2010 Jun;51(6):1564-8.

-
- ¹²⁵ Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Howe F, Wilson WR, Loftus IM, Thompson MM. Vascular endothelial growth factor enhances angiotensin II-induced aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Vasc Surg* 2010;52:159-66.
- ¹²⁶ Tomita N, Yamasaki K, Izawa K, Kunugiza Y, Osako MK, Ogihara T, Morishita R. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm progression by nifedipine. *Int J Mol Med* 2008;21:239-44.
- ¹²⁷ Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA, Kallmes DF. ARRS Executive Council Award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: a model suitable for testing endovascular devices. American Roentgen Ray Society. *AJR Am J Roentgenol* 1999;2000:349-54.
- ¹²⁸ Strindberg G, Nichols P, Ricci MA, Marinov G, Marois Y, Roby P, Guidoin R. Experimental modifications to a canine infrarenal aortic aneurysm model for the validation of endovascular stent-grafts: an exploratory study. *J Invest Surg* 1998;11:185-97.
- ¹²⁹ Moláček J, Treska V, Kober J, Certík B, Skalický T, Kuntscher V, Krízková V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm—experiment in an animal model. *J Vasc Res* 2009;46:1-5.
- ¹³⁰ Matsunaga K, Takasawa C, Seiji K, Takase K, Takahashi S, Matsuhashi T, Nakamura Y, Fujisihima F. Endovascular aneurysmal models at the external iliac artery of dogs. *J Vasc Surg* 2012;55(6):1742-8.
- ¹³¹ Gorlin J. Stem cell cryopreservation. *J Infus Chemo* 1996(1):23-7.
- ¹³² Riera L, Largo C, Ramírez JR, García Arranz M, Riera L, García Olmo D. Experimental model for coadjuvant treatment with mesenchymal stem cell for aortic aneurysm. *Am J Stem Cell* 2012(1):3.
- ¹³³ Suleiman NH. Stent coronarios y prevención de reestenosis: II parte: estrategias. *Medicrit* 2006. (3)4:90-9.
- ¹³⁴ Ao PY, Hawthorne WJ, Coombs R. Suppression of intimal hyperplasia with low molecular heparin in a ship model. *Int Angiol* 1999. 18(2):131-9.
- ¹³⁵ Stripecke R, Carmen Villacres M, Skelton D, Satake N, Halene S, Kohn D. Immune response to GFP, implication for gene therapy. *Gene Ther* 1999;6(7):1305-12.
- ¹³⁶ Wilson WR, Wills J, Furness PN, Loftus IM, Thompson MM. Abdominal aortic aneurysm rupture is not associated with an up-regulation of inflammation within the aneurysm wall. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;40(2):191-5.
- ¹³⁷ Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros Marcos D, Pascual Miguelañez I. Fibrina y terapia celular en el tratamiento de la patología fistulosa en la enfermedad de Crohn. Protocolo y resultados de un ensayo clínico en fase I. *Rev Esp Enferm Dig* 2005. 97(Supl. II):51-54.)
- ¹³⁸ Davies MJ. Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models. *Circulation* 1998;98(3):193-5.
- ¹³⁹ Hallin A, Bergqvist D, Holmberg L. Literature review of surgical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;22(3):197–204.
- ¹⁴⁰ Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW Jr, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS; Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the joint council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 2003;37(5):1106–1117.
- ¹⁴¹ Matsumura JS, Brewster DC, Makaroun MS, Naftel DC. A multicenter controlled clinical trial of open versus endovascular treatment of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;37(2):262-71.
- ¹⁴² Ouriel K. The PIVOTAL study: a randomized comparison of endovascular repair versus surveillance in patients with smaller abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2009;49(1):266-9.
- ¹⁴³ Cao P; CAESAR Trial Collaborators. Comparison of surveillance vs Aortic Endografting for Small Aneurysm Repair (CAESAR) trial: study design and progress. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30(3):245-51.

¹⁴⁴ Greenberg R, Fairman R, Srivastava S, Criado F, Green R. Endovascular grafting in patients with short proximal necks: an analysis of short-term results. *Cardiovasc Surg* 2000;8:350-4.

¹⁴⁵ De Rango P, Cao P, Parlani G, Verzini F, Brambilla D. Outcome after endografting in small and large abdominal aortic aneurysms: a metaanalysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008;35:162-72.

¹⁴⁶ Ouriel K, Srivastava SD, Sarac TP, O'hara PJ, Lyden SP, Greenberg RK, Clair DG, Sampram E, Butler B. Disparate outcome after endovascular treatment of small versus large abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2003;37(6):1206-12.

¹⁴⁷ Baum RA, Stavropoulos SW, Fairman RM, Carpenter JP. Endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14:1111-7.

¹⁴⁸ Houballah R, Majewski M, Becquemin JP. Significant sac retraction after endovascular aneurysm repair is a robust indicator of durable treatment success. *J Vasc Surg* 2010;52(4):878-83.

¹⁴⁹ Parr A, McCann M, Bradshaw B, Shahzad A, Buttner P, Golledge J. Thrombus volume is associated with cardiovascular events and aneurysm growth in patients who have abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2011;53(1):28-35.

¹⁵⁰ Ensayo Clínico en Fase III (FATT I) multicéntrico, simple ciego, aleatorizado, coomparativo y Add-on, en tres grupos paralelos para evaluar la eficacia y seguridad de una nueva terapia con células madre autólogas derivadas de tejido adiposo, para el tratamiento de las fístulas perianales complejas en pacientes sin enfermedad inflamatoria intestinal. NCT00475410

¹⁵¹ Díaz-Agero P, García-Arranz M, Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells: a case report. *Thorax* 2008 63(4):374-6